

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS CENTRO DE ESTUDIOS AMBIENTALES (CEA) MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL II COHORTE

“Calidad de agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la rana *Gastroteca sp.* en Cuenca y bioensayo toxicológico de sus larvas en medios acuáticos con diferentes concentraciones de nitrito de sodio.”

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGISTER EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL

AUTOR:

Bqf. Paúl Adrián León Cajamarca
C.I. 0104795919

DIRECTOR:

Blgo. Julio Danilo Mejía Coronel M.Sc.
C.I. 0103638581

**CUENCA - ECUADOR
2018**



Resumen

La rana marsupial del Azuay *Gastrotheca sp.* (ex *litonelis*; nueva descripción pendiente), además de haber disminuido su población en la ciudad de Cuenca, ha sido poco estudiada. Por ello, se está ejecutando un proyecto de implementación de pozas artificiales que permitan su recuperación y estudio. Para contribuir con el desarrollo de ese proyecto, en la presente investigación se determinó el pH, conductividad, oxígeno disuelto, temperatura, nitritos, y nitratos de las pozas artificiales y además también, se evaluó el porcentaje de mortalidad, la concentración letal media, el NOAEC y LOAEC de larvas de rana *Gastrotheca sp.* sometidas a medios acuáticos con diferentes concentraciones de Nitrito de Sodio. La medición de parámetros relacionados de calidad de agua se realizó entre octubre de 2016 y enero de 2017; por su parte, el bioensayo se realizó entre los meses de febrero y marzo de 2017. Los valores de temperatura, pH, conductividad y oxígeno disuelto, se encuentran relativamente dentro de los límites permitidos. Sin embargo, existen indicios de deterioro en la calidad de agua de las pozas debido a que la concentración de nitritos y nitratos es elevada en ciertos puntos. La dosis letal media del Nitrito de Sodio sobre larvas de estadio de 25-30 en la escala de Gosner de *Gastrotheca sp.* fue de 42.95 mg/L en 120 horas.

Palabras Clave: *Gastrotheca sp.*, Bioensayo Toxicológico, Calidad de Agua, Toxicidad, Nitrito de Sodio



Abstract

The marsupial frog of Azuay *Gastrotheca sp.* (ex *litonelis*, new description pending), in addition to having decreased its population in Cuenca, Ecuador has been little studied. For this reason, a project to implement artificial pools that allow its recovery and study is being executed. In order to contribute with the development of this project, in the present research the pH, conductivity, dissolved oxygen, temperature, nitrites and nitrates of the water of the artificial pools were determined, as well as the percentage of mortality, the concentration lethal medium, the NOAEC and LOAEC of frog larvae *Gastrotheca sp.* subjected to aquatic environments with different concentrations of sodium nitrite. The measurement of related parameters of water quality was made between October 2016 and January 2017; in other hand the bioassay was made between the months of February and March 2017. The values of temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen are relatively within the permitted limits. However, there are signs of deterioration in the water quality of the ponds due to the high concentration of nitrites and nitrates at certain points. The average lethal dose of sodium nitrite on stage 26-30 larvae on the Gosner scale of *Gastrotheca sp.* was 42.95 mg / L in 120 hours.

Key Words: *Gastrotheca sp.*, Toxicological Bioassay, Water Quality, Toxicity, Sodium Nitrite



Índice

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Índice.....	4
Índice de Tablas.....	8
Índice de Figuras.....	9
Índice de Anexos.....	10
Abreviaturas.....	12
Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio	
Institucional.....	13
Cláusula de Propiedad Intelectual.....	14
Agradecimientos.....	15
Dedicatoria.....	16
Capítulo I.....	17
Introducción.....	17
1.1 Antecedentes.....	18
1.2 Justificación.....	19
1.3 Alcance.....	20
1.4 Principios Éticos.....	21
Capítulo II.....	22
Revisión Bibliográfica.....	22
2.1 Anfibios.....	22
2.1.1 Taxonomía.....	22
2.1.2 Disminución Poblacional de Anfibios.....	23
2.1.3 Hábitats artificiales para anfibios.....	23
2.1.4 Anuros.....	24
2.1.4.1 Género <i>Gastrotheca</i>	25
2.1.4.1.1 Especie <i>Gastrotheca sp.</i>	26
2.1.4.1.2. Estudios Especie <i>Gastrotheca sp.</i>	28
2.2 Agua.....	28
2.2.1 Calidad de agua.....	29
2.2.1.1 Indicadores de calidad de Agua.....	30
2.2.1.1.1 Indicadores Físicos.....	31



2.2.1.1.1.1	Potencial de Hidrógeno o pH	31
2.2.1.1.1.2	Temperatura.....	31
2.2.1.1.1.3	Conductividad	32
2.2.1.1.2	Indicadores Químicos.....	32
2.2.1.1.2.1	Oxígeno Disuelto.....	32
2.2.1.1.2.2	Nitratos.....	33
2.2.1.1.2.3	Nitritos	34
2.2.1.2	Requerimientos Anfibios en cautiverio	35
2.3	Contaminantes derivados del Nitrógeno	36
2.3.1	Efecto Nitrógeno en Hábitats de anfibios.....	36
2.4	Ecotoxicología.....	37
2.4.1	Eutrofización	37
2.4.2	Bioindicadores	38
2.4.2.1	Anfibios como bioindicadores.....	40
2.4.3	Bioensayos de Toxicidad	41
2.4.3.1	Bioensayos en Anfibios	42
Capítulo III	44
Hipótesis y Objetivos	44
3.1	Hipótesis	44
3.1.1	Hipótesis Generales.....	44
3.1.2	Hipótesis Específicas.....	44
3.2	Objetivos	44
3.2.1	Objetivos Generales	44
3.2.2	Objetivos Específicos.....	45
Capítulo IV	46
Materiales y Métodos	46
4.1	Tipo de Estudio	46
4.2	Área de Estudio.....	46
4.3	Método de Análisis de Variables.....	47
4.4	Muestreo	49
4.4.1	Frecuencia de Muestreo	50
4.4.2	Ficha de muestreo	50
4.5	Materiales y Equipos.....	51
4.6	Análisis de Variables.....	52



4.6.1 Determinación de pH, Conductividad, Temperatura del Agua, Oxígeno Disuelto	52
4.6.2 Determinación de Nitritos y Nitratos.....	53
4.6.3 Bioensayo toxicológico	54
4.6.3.1 Elección de la Población de Larvas de la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	54
4.6.3.2 Procedimiento del bioensayo toxicológico con larvas de la especie <i>Gastrotheca sp.</i> frente a concentraciones ascendentes de nitrito de sodio.....	55
4.6.3.3 Uso del Método Log-Logístico Binomial.....	55
4.6.3.4 Fórmulas para el Cálculo de Dosis Referenciales	56
Capítulo V.....	58
Resultados	58
5.1 Observaciones Organolépticas	58
5.2 pH, Conductividad, Temperatura del Agua y Oxígeno Disuelto de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	61
5.2.1 pH de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	61
5.2.2 Temperatura del Agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	63
5.2.3 Oxígeno Disuelto de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	66
5.2.4 Conductividad de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	70
5.3 Nitritos y Nitratos de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	73
5.3.1 Análisis de la poza PAR2.....	78
5.4 Resultado Bioensayo toxicológico del Nitrito de Sodio en larvas de la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	79
5.4.1 Estado inicial de las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i>	79
5.4.2 Necropsia de las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i>	80
5.4.3 Bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de <i>Gastrotheca sp.</i>	81



5.4.3.1 Evaluación físico química de los terrarios.....	83
5.4.3.2 Bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de <i>Gastrotheca sp.</i> en 96 horas	84
5.4.3.3 Bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de <i>Gastrotheca sp.</i> en 120 horas	85
5.4.3.4 Comparación entre los modelos 96h-120h.....	87
5.4.3.5 Relación entre la mortalidad de las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i> con el tiempo.....	87
Capítulo VI.....	89
Discusión.....	89
6.1 Parámetros físico-químicos de la calidad del agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	89
6.1.1 pH de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	90
6.1.2 Conductividad de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	90
6.1.3 Temperatura del Agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	91
6.1.4 Oxígeno Disuelto de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	92
6.1.5 Concentración de Nitritos y Nitratos de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	93
6.2 Bioensayo toxicológico de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	94
6.2.1 Estado de las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i>	94
6.2.2 Necropsias en las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i>	94
6.2.3 Mortalidad de las larvas de la especie <i>Gastrotheca sp.</i>	95
6.2.4 Bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de <i>Gastrotheca sp.</i> en 96 horas	96
6.2.5 Bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de <i>Gastrotheca sp.</i> en 120 horas	96
6.2.6 Comparación con estudios similares	97
Capítulo VII.....	99
Conclusiones.....	99



7.1 Parámetros físico-químicos de calidad de agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp</i>	99
7.2 Bioensayo Toxicológico con nitrito de sodio en larvas de <i>Gastrotheca sp</i>	100
7.3 Recomendaciones	100
Bibliografía	102
Anexos	109

Índice de Tablas

Tabla 1. Ubicación de hábitats artificiales implementados para la conservación de anfibios por el GAD municipal de Cuenca.....	47
Tabla 2. Descripción de la metodología usada para la determinación de las variables analizadas en la presente investigación.....	48
Tabla 3. Observaciones organolépticas realizadas en las pozas diseñadas para el programa de conservación de anfibios.....	58
Tabla 4. pH de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp</i>	61
Tabla 5. Temperatura del Agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp</i>	64
Tabla 6. Oxígeno Disuelto de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp</i> . medida en partes por millón.....	67
Tabla 7. Oxígeno Disuelto de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp</i> . medida en porcentaje.	67
Tabla 8. Conductividad de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp</i> . ($\mu\text{s}/\text{cm}$).....	71
Tabla 9. Valores de Nitritos de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp</i> . (mg/L)	74
Tabla 10. Valores de Nitratos de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie <i>Gastrotheca sp</i> . (mg/L)	75
Tabla 11. Caracterización de la muestra PAR2.....	78



Tabla 12. Estado general de las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i> que participan en el bioensayo toxicológico con nitrito de sodio. Notas. APAB: Ausencia parcial de aparato bucal (hileras de dientes). ATAB: Ausencia total del aparato bucal. AS: Aparentemente sanos.	80
Tabla 13. Supervivencia de las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i> que se someten a concentraciones ascendentes de nitrito de sodio.	82
Tabla 14. Duplicado de la supervivencia de las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i> que se someten a concentraciones ascendentes de nitrito de sodio.	82
Tabla 15. Características Físico-Químicas de los terrarios utilizados para el desarrollo del bioensayo toxicológico.	83
Tabla 16. Valores obtenidos a partir del bioensayo toxicológico del nitrito de sodio en larvas de la especie <i>Gastrotheca sp.</i> en 96 horas de ensayo.	85
Tabla 17. Valores obtenidos a partir del bioensayo toxicológico del nitrito de sodio en larvas de la especie <i>Gastrotheca sp.</i> en 120 horas de ensayo.	86
Tabla 18. Comparación entre los modelos 96h y 120h mediante los criterios AIC y BIC.	87

Índice de Figuras

Figura 1. Rana especie <i>Gastrotheca sp.</i>	27
Figura 2. Hembra de <i>Gastrotheca sp.</i> con huevos en el marsupio.	27
Figura 3. Toma de muestra de agua para análisis en laboratorio.	50
Figura 4. Comportamiento de pH del agua de las pozas con relación al tiempo de duración del estudio durante las campañas de monitoreo	62
Figura 5. Comportamiento del pH del Agua de las pozas en cada sector de la ciudad.	63
Figura 6. Comportamiento de la Temperatura del Agua de las pozas durante las campañas de monitoreo.	65
Figura 7. Comportamiento de la Temperatura del Agua de las pozas en cada sector de la ciudad.	66
Figura 8. Comportamiento del Oxígeno Disuelto en el agua de las pozas durante las campañas de monitoreo.	68



Figura 9. Comportamiento del Oxígeno Disuelto del agua de las pozas en cada sector de la ciudad.	70
Figura 10. Comportamiento de la Conductividad del agua de las pozas durante las campañas de monitoreo.	72
Figura 11. Comportamiento del Conductividad del agua de las pozas en cada sector de la ciudad.	73
Figura 12. Comportamiento de los nitritos presentes en el agua de las pozas durante las campañas de monitoreo.	74
Figura 13. Comportamiento de los Nitritos del agua de las pozas en cada sector de la ciudad.	75
Figura 14. Comportamiento de los Nitratos en el agua de las pozas durante las campañas de monitoreo.	76
Figura 15. Comportamiento de los Nitratos del agua de las pozas en cada sector de la ciudad.	78
Figura 16. a) Ausencia total de hilera de dientes. b) Presencia del aparato bucal zona negra a la entrada de la cavidad oral.	79
Figura 17. a) Hígado pálido con zonas hemorrágicas. b) Hemorragia entre asas intestinales.	81
Figura 18. Curva Dosis – Respuesta del bioensayo toxicológico con nitrito de sodio frente a las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i> en 96 horas	84
Figura 19. Curva Dosis – Respuesta del bioensayo toxicológico del nitrito de sodio frente a las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i> en 120 horas	86
Figura 20. Mortalidad de las larvas de la especie <i>Gastrotheca sp.</i> vs. Tiempo de Experimentación a distintas dosis de NaNO_2	88
Figura 21. Duplicado del ensayo de mortalidad de las larvas de la especie <i>Gastrotheca sp.</i> vs. Tiempo de Experimentación a distintas dosis de NaNO_2 .	88

Índice de Anexos

Anexo 1: Reconocimiento de las pozas	109
Anexo 2: Análisis de Laboratorio.....	110
Anexo 3: Mapa de Ubicación de las pozas	111



Anexo 4: Ficha de monitoreo en campo para hábitats de anfibios amenazados.
..... 112

Anexo 5: Resultados Análisis Físico Químicos 112

Anexo 6: Bioensayo Toxicológico..... 117



Abreviaturas

CCA: Centro de Conservación de Anfibios del Zoológico Bioparque Amaru

TULSMA: Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente

CGA: Comisión de Gestión Ambiental

GAD: Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Cuenca

DL50: Dosis Letal media

CL50: Concentración Letal Media o Concentración Letal 50

CL90: Concentración Letal 90

BMDL: Benchmark dose lower (Concentración a la que no se observan efectos)

BMD: Benchmark dose (Concentración a la que se observa el primer efecto)

Ppm: Partes por millón

mg/L: miligramos por cada litro

mm: milímetros

us/cm: microsiemens por cada centímetro

UICN: Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza

AIC: Criterio de información Akaike

BIC: Criterio de información Bayesiano

Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Paúl Adrián León Cajamarca en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Calidad de agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la rana *Gastroteca sp.* en Cuenca y bioensayo toxicológico de sus larvas en medios acuáticos con diferentes concentraciones de nitrito de sodio", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 26 de Febrero de 2018



BQF. Paúl Adrián León Cajamarca

C.I: 0104795919



Cláusula de Propiedad Intelectual

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Paúl Adrián León Cajamarca, autor/a del trabajo de titulación “Calidad de agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la rana *Gastroteca sp.* en Cuenca y bioensayo toxicológico de sus larvas en medios acuáticos con diferentes concentraciones de nitrito de sodio”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 26 de Febrero de 2018

A handwritten signature in blue ink, reading 'Paúl León', written over a horizontal line.

BQF. Paúl Adrián León Cajamarca

C.I: 0104795919



Agradecimientos

Un agradecimiento muy sentido para el director de este trabajo de titulación Blgo. Danilo Mejía Coronel, Msc por el apoyo y ayuda en la ejecución del proyecto, además por el interés que brindo en cada momento para poder cumplir los objetivos trazados.

De igual manera a la Ing. Lorena Abad Crespo, por el apoyo en cada una de las etapas de esta investigación, por brindar todo su conocimiento y sapiencia al éxito de cada meta propuesta en el presente estudio.

Al Zoológico Bioparque Amaru en la persona del Blgo. Fausto Siavichay por abrirnos las puertas de las instalaciones del Centro de Conservación de anfibios (CCA) para la ejecución de gran parte de la investigación, además por toda la asesoría e interés brindado al éxito del proyecto.

A todos los docentes de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca en especial a las Doctoras Lourdes Jerves Andrade y Ruth Rosas Tapia por el apoyo incondicional y desinteresado, además por las palabras de aliento y cariño que siempre me han sabido brindar conjuntamente con los amplios conocimientos en sus respectivas áreas.

En general a la Comisión de Gestión Ambiental de Cuenca, al personal del CEA-Universidad de Cuenca, al Dr. Geovanny Larriva director del laboratorio de análisis de agua de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca y al laboratorio CECEMIN de la Universidad de Cuenca, por abrir las puertas de sus respectivas instalaciones en pro de la consecución de este proyecto de investigación.

Finalmente a mi familia, a mis amigos y a todas las personas que con sus palabras de aliento me ayudaron a seguir adelante y de una u otra manera han sido fundamentales para poder alcanzar mis objetivos y metas personales, un sincero agradecimiento y mis más profundos sentimientos de cariño y estima.

Gracias por todo
Paúl León Cajamarca



Dedicatoria

A Dios y a la Santísima Virgen María por ser mi fortaleza espiritual.

A mi familia Manuel, Luz, Santy y Xavi por todo lo que me han dado y por hacerme la persona que soy hoy en día.

A mis abuelitos, Carlos y Naty porque no hubo un solo día que no piense y pida a Dios por ellos.

Y por supuesto con todo el amor que me cabe a uno de las personas de quien más he sentido un cariño incondicional, quien me quiso desde el primer día que nací, hasta el último día que Dios me bendijo con su presencia a mi lado, a mi abuelito Félix que desde donde esté tengo la plena seguridad que me está cuidando y es el ángel que la vida me ha regalado.

Por Ustedes

Los amo mucho



Capítulo I

Introducción

La rana marsupial del Azuay *Gastrotheca sp.* (Descripción actualizada pendiente, ex *G. litonedis*; Siavichay et al, 2016), es una especie nativa de anfibio que ha sido muy poco estudiada y que se encuentra restringida a pequeñas y pocas áreas de los Andes ecuatorianos (Arbeláez y Vega, 2014; Siavichay et al, 2016). Actualmente, es un hecho muy evidente que la población de esta especie en la ciudad de Cuenca casi ha desaparecido por el crecimiento de la urbe (González, 2010; Siavichay et al, 2016). Ante esta realidad, el Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) de la ciudad de Cuenca ha implementado pozas artificiales de agua con el fin de estudiar y recuperar esta especie (AMARU, 2013; CGA, 2017).

Para el desarrollo de ese proyecto de recuperación de la rana nativa, es indispensable evaluar la calidad del agua de las pozas y conocer la vulnerabilidad toxicológica de *Gastrotheca sp.* frente a potenciales contaminantes como son, los elementos nitrogenados provenientes de los procesos naturales biogeoquímicos y de eutrofización (Mühlhauser y Vila, 1987; Barrientos, 2010).

Por esa razón, este proyecto de investigación se propuso como objetivos generales: (1) Evaluar los parámetros físico-químicos de calidad del agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.* en Cuenca, en función con los valores referenciales para la preservación de flora y fauna en agua dulce; y (2) Determinar el porcentaje de mortalidad de larvas de rana *Gastrotheca sp.* en medios acuáticos con diferentes concentraciones de Nitrito de Sodio. Mientras que como objetivos específicos se planteó: (i) Evaluar los valores de pH, conductividad, oxígeno disuelto, temperatura, nitritos y nitratos de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*, en función de los valores de referencia requeridos para la preservación de flora y fauna. (ii) Determinar el porcentaje de mortalidad, la concentración letal media, el NOAEC y LOAEC de larvas de rana *Gastrotheca sp.* sometidas a medios acuáticos con diferentes concentraciones de Nitrito de Sodio.



Los resultados de este estudio han permitido conocer: la calidad de agua de las pozas, la diferencia de calidad de agua entre diferentes pozas, la variación de los parámetros de calidad de agua a lo largo del tiempo, si el sector afecta a la calidad de agua, y a qué dosis del principal potencial contaminante, nitrito de sodio, la especie *Gastrotheca sp.* presenta afecciones.

Las conclusiones obtenidas contribuyen a desarrollo de conocimiento necesario para realizar con éxito las actividades de conservación y recuperación de la rana marsupial azuaya.

1.1 Antecedentes

Se ha documentado la disminución en la población de anfibios en muchas regiones y hábitats, pero no se ha demostrado alguna causa específica y se han sugerido distintos estresores como precipitaciones ácidas, contaminantes ambientales, la introducción de predadores exóticos, agentes infecciosos, parásitos y los efectos de radiación ultravioleta; por esta susceptibilidad, los anfibios son indicadores importantes de la salud de un ecosistema (Barberá et al, 1999).

La especie de rana *Gastrotheca sp.* está siendo estudiada en los últimos años, una de las razones es que habita en algunos lugares de Sudamérica, especialmente distribuida en Ecuador (Azuay), por esta consideración se la cataloga como una especie endémica y protegida (Duellman, Catenazzi, & Blackburn, 2011), para este fin se está creando hábitats de protección para estos anfibios, los cuales deben cumplir con ciertos parámetros para asegurar el desarrollo de esta especie (Poole & Grow, 2008), para los cuales hay consideraciones dadas por las principales organizaciones reguladoras de calidad de agua para la conservación del hábitat de anfibios (Jimenez & Martín, 2007; Poole & Grow, 2008; TULSMA, 2010).

La Guía para el manejo de anfibios en cautiverio de la asociación de Zoológicos y Acuarios establece que bacterias y diferentes factores propios del ecosistema transforman sustancias derivadas del nitrógeno como amonio y amoniaco propias del metabolismo de la fauna acuática en productos menos tóxicos como nitratos y nitritos que se acumulan en el agua (Poole & Grow,



2008). Además diferentes actividades humanas como agricultura, aguas residuales y utilización de fertilizantes, introducen una importante concentración de nitritos al agua y altera de manera significativa los ecosistemas acuáticos (Rice, Mazzotti, Waddle, & Conill, 2014).

Como indica Adolfo Marco, las concentraciones de sustancias nitrogenadas consideradas inocuas en el consumo humano son nocivas y letales para larvas recién eclosionadas de anfibios (Marco, 2002). Una explicación para esto es el ciclo de vida de los anfibios, quienes pasan sus primeras etapas de desarrollo en el agua y afrontan la contaminación sin los mecanismos de defensa propios de la especie ya desarrollada por completo (Poole & Grow, 2008). Se han realizado numerosos estudios que prueban los efectos tóxicos de los nitritos en diferentes especies de rana medidos como problemas en la reproducción, eclosión de los huevos, dificultad para realizar la metamorfosis, mortalidad, etc (Marco & Blaustein, 1998; Kerry & Griffis, 2005).

En estos estudios se observa una diferencia en la susceptibilidad a las soluciones de nitrito entre las diferentes especies de anfibios estudiados por lo que debe caracterizarse de forma independiente para cada especie y con especial atención para la especie denominada rana marsupial azuaya o *Gastrotheca sp.*, la cual, al ser una especie propia de los Andes de Sudamérica, posee características diferentes a las que se puede encontrar en estudios previamente realizados en otras especies.

1.2 Justificación

En virtud de lo expuesto podemos establecer como una problemática para los anfibios la alteración de la química del agua debido al aumento de la concentración de nitrógeno y en especial de nitritos en el agua, pudiendo provocar diferentes alteraciones en los anfibios y así dificultar su normal desarrollo, reproducción y supervivencia (Poole & Grow, 2008).

El estudio plantea entonces evaluar la calidad físico química del agua de las pozas implementadas por el GAD municipal de Cuenca en el programa para la conservación de la fauna urbana, medida en parámetros (pH, conductividad eléctrica, temperatura, oxígeno disuelto, nitritos y nitratos) que pueden afectar



el normal desarrollo, reproducción y supervivencia de las ranas, además de evaluar la toxicidad aguda que pueden generar los nitritos sobre *Gastrotheca sp.*

1.3 Alcance

Este estudio beneficia a la comunidad científica, puesto que, es fundamental conocer más acerca de *Gastrotheca sp.* de la cual hay escasa información debido a que su distribución geográfica se limita únicamente a los Andes ecuatorianos. El enfoque de la presente investigación establece lineamientos que servirán como herramienta de monitoreo para evaluar la eficiencia del programa implementado por el GAD municipal de Cuenca que tiene como objetivo realizar el diagnóstico y manejo ex-situ de especies críticamente amenazadas de extinción en zonas urbanas de la ciudad.

El estudio servirá de modelo para el control de hábitats naturales y artificiales de anfibios, donde el interés primordial es mantener las concentraciones de nitritos y nitratos dentro de los límites aceptables para garantizar la supervivencia y desarrollo de los individuos presentes en los ecosistemas acuáticos.

El impacto de la presente investigación se basa en dos puntos fundamentales; el primero es establecer parámetros físico químicos de importancia en los hábitats artificiales de anfibios y el segundo obtener datos acerca de la concentración de nitritos en el agua y compararlos con un bioensayo de toxicidad a base de nitrito de sodio.

El GAD municipal de la ciudad de Cuenca plantea un programa completo de conservación de las distintas especies de anfibios presentes en la ciudad; dentro de este planteamiento es importante la estandarización de ciertos parámetros de calidad de agua que puedan interferir con el normal funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, por lo que la presente investigación sirve para la toma de decisiones en futuras investigaciones.



1.4 Principios Éticos

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizaron larvas de animales nacidos en cautiverio que provienen de una descendencia de hace mínimo dos generaciones de animales obtenidos igualmente en cautiverio en el Centro de Conservación de Anfibios (CCA) del zoológico bioparque AMARU, lo que según la legislación ecuatoriana es un justificativo válido para la utilización de animales de experimentación con fines de estudios relevantes.



Capítulo II

Revisión Bibliográfica

2.1 Anfibios

Son clasificados como los primeros vertebrados terrestres, derivados de los peces de la especie *Crossopterigios*, con adaptaciones especiales en los miembros y aparición de pigmentos propios de cada especie, sin embargo, actualmente se consideran los vertebrados peor adaptados a la vida terrestre debido a la escasa queratinización y a que sus embriones se desarrollan sin una membrana amniótica (Barbadillo, 1999).

Los anfibios no disponen de escamas, pero tienen un desarrollado sistema de glándulas que permiten la constante lubricación de la piel y la producción de alcaloides tóxicos para otras especies que sirven como un mecanismo de defensa contra depredadores; otra característica especial es el cambio de color de la piel conocida como mimetismo, que les sirve para protegerse de los rayos solares y en cierta medida para la regulación térmica necesarias para la supervivencia (Barbadillo, 1999).

Los anfibios merecen especial atención por parte de la comunidad científica debido a que son considerados como valiosos indicadores de calidad ambiental y ecológica, además poseen múltiples papeles funcionales dentro de los ecosistemas acuáticos y terrestres (Escanta, 2007; Pacheco, 2015).

2.1.1 Taxonomía

Desde el punto de vista taxonómico los anfibios pertenecen al Reino: Animalia, Filo: Cordata, Subfilo: Vertebrata, Superclase: Tetrapoda, Infraclo: Gnathostomata, Clase: Amphibia; comparten características importantes como la presencia de notocordio o cuerda floral, columna vertebral, cuatro extremidades y una mandíbula bien articulada (Gonzalez, 2002).

El presente estudio se concentra en la conservación y el análisis de anfibios del orden Anura, es decir sapos y ranas que pertenecen al género *Gastrotheca* especie *sp.*



2.1.2 Disminución Poblacional de Anfibios

En los últimos años se ha producido un importante declive de la población de anfibios a nivel global, lo que resulta alarmante para la comunidad científica debido a que no existe una causa aparente para este fenómeno que en principio se responsabilizó a la contaminación y destrucción de hábitats propios de anfibios pero que luego se observó extinción de anfibios como la rana australiana y el sapo dorado de Costa Rica de forma muy rápida y en hábitats bien conservados (Baez et al, 2013).

El grupo de evaluación global de los anfibios (GAA) ha reportado que el 42% de las poblaciones de anfibios ha sufrido una disminución en sus poblaciones y que un 32% se encuentran gravemente amenazadas o se han extinguido en los últimos 100 años y un total de 159 especies que se han extinto en la última década (Baez et al, 2013).

Baez, Romero & Ferri (2013), han estudiado los problemas relacionados con el calentamiento global y sugieren que los anfibios son el primer indicador fehaciente de la degradación ambiental y a esto se debe claramente el declive de estas especies, argumentando además la dificultad que genera en estas especies el desplazamiento y adaptación a condiciones más benignas en donde puedan desarrollarse con normalidad, por lo que se propone la creación de hábitats artificiales como una probable solución temporal a la acelerada desaparición de tantas especies de anfibios, especialmente aquellas consideradas críticamente amenazadas.

2.1.3 Hábitats artificiales para anfibios

En zonas urbanas y periurbanas de las ciudades se han creado naturalmente hábitats aptos para el desarrollo del ciclo de vida de una variedad de anfibios, sin embargo la creciente urbanización y aumento de construcciones destroza estas zonas, influyendo de gran manera en la disminución de la población de ranas que habitan en estos lugares, lo que crea la necesidad de la creación de hábitats artificiales para la conservación de estas especies (Sanchez et al., 2015).



A nivel mundial se proponen alternativas para llevar a cabo un plan sustentable encaminado a conservar estas especies, es así que científicos argentinos liderados por Victor Zaracho plantean aspectos importantes para garantizar la reproducción de los mismo (Zaracho et al, 2005), otros autores (Brambilla, 2003; Angulo et al, 2006), junto con a organizaciones como ZOOAcuarius y la consejería de Medio Ambiente de Madrid plantean crear hábitats artificiales de cautiverio para cuidar de la preservación de estas especies (Reforesta, 2007; Agostini, 2013).

Como se manifiesta en el Manual de Anfibios Urbanos de Cuenca, se ha evidenciado que los anfibios se encuentran adaptados a diversos tipos de ecosistemas (Siavichay, Maldonado & Mejía, 2016), sin embargo los hábitats para anfibios tienen una relación directa con el uso del suelo alrededor, debido a que interactúa con el ciclo de vida de los anfibios, tomando en cuenta que es el lugar de desove y desarrollo de las larvas, además las formas juveniles utilizan los hábitats terrestres cercanos para forrajeo y refugio. Con estas características la actividad antropogénica altera las propiedades fisicoquímicas de los hábitats tanto terrestres como acuáticos e influencia en el normal desarrollo de las poblaciones de anfibios (Simon et al, 2009).

2.1.4 Anuros

El orden anura conocido más popularmente como ranas o sapos son vertebrados provenientes de la clase Amphibia que comparten rasgos taxonómicos muy característicos como tener un cuerpo de pequeño tamaño y ensanchado, extremidades con un notable desarrollo y adaptadas para realizar saltos y la ausencia total de cola (Baez et al, 2013).

La disminución de la cantidad de anfibios resulta alarmante y constituye un problema a global (Marco, 2002); la organización ZooAmphibian atribuye este declive al crecimiento poblacional debido a que se destruyen sus hábitats naturales por el crecimiento urbano (Poole & Grow, 2008); otros autores en sus respectivos estudios determinan que el aumento del nitrógeno en el agua producto de actividades humanas como agricultura o asentamientos urbano es la principal razón del declive de estas especies (Lips & Reader 1999).



Así mismo con los anuros se da un dato curioso, si bien la disminución de la población de estos animales es notoria, llegando incluso a la extinción de algunas especies muy conocidas y endémicas de algunas zonas; también un gran número de especies se reportan como nuevas o no descritas taxonómicamente, esto según (Guayasamin & Bonaccorso, 2004), se debe a las diferencias ya sea morfológicas y genéticas o al encuentro de nuevas poblaciones de anfibios con características diferentes a las ya definidas en otras especies, lo que lleva a describirlas como hallazgos taxonómicos con características propias.

En el Ecuador algunos científicos han estudiado el estado poblacional de las ranas (Yáñez et al, 2009); observando un claro declive principalmente en especies como *Hyloscirtus*, *Centrolenidae* (Yáñez, 2010), igualmente la rana terrestre *Pristimantis* y *Hyloxalus delatorreae* más conocida como la rana nodriza en la cual se considera alarmante su disminución poblacional (Yáñez & Herrera, 2009).

En dichos estudios se identifica también una considerable reducción en el número de individuos de especies menos comunes en los distintos parques protegidos del país, especialmente toman como referencia a los parques ubicados en el distrito metropolitano de Quito (Yáñez, 2005).

2.1.4.1 Género *Gastrotheca*

Entre los géneros de ranas marsupiales, uno de los que más trascendencia tiene es *Gastrotheca*, debido a su diseminación global especialmente en los bosques naturales de Sudamérica; la taxonomía de este género, como de toda la familia de anuros es compleja y se encuentran diferentes especies derivadas muchas de ellas no identificadas aún (Escanta, 2007; Rice et al, 2014).

En cuanto a la descripción de la morfología, el género *Gastrotheca* se caracteriza por tener las extremidades o miembros cortos en relación al tamaño del cuerpo, discos digitales pequeños con membranas interdigitales relativamente extensas, presencia de manchas en la piel en especial en la zona ventral de los miembros con una variación en el rostro que va desde redondeado hasta prominente dependiendo de la especie; la longitud rostro



cloacal del macho varía entre 34 y 56 milímetros y de la hembra varía entre 35 y 64 milímetros según la especie, como se observa en las figuras 1 y 2 (Ron et al, 2016).

En Ecuador se han descrito algunas especies del género *Gastrotheca* en especial en los bosques y áreas protegidas de las regiones orientales y de la sierra; investigadores de Amphibia web Ecuador han documentado la presencia de *Gastrotheca espeletia* y *Gastrotheca pseustes*, comúnmente encontradas al norte del país; así como la recientemente descrita especie *Gastrotheca riobambae*, en las mismas localizaciones y la especie todavía no descrita *Gastrotheca sp.* al sur del país que se puede considerar endémica de la provincia del Azuay-Ecuador, en donde también se ha documentado la presencia de *Gastrotheca pseustes* (Ron et al, 2016) (Siavichay et al, 2016).

El estado de conservación de este anuro llama la atención, debido a que según la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), está en lista roja, lo que significa que se la considera en peligro de extinción, así mismo para la organización Amphibia Web Ecuador se la cataloga como una especie vulnerable (Ron et al, 2016; UICN, 2017).

2.1.4.1.1 Especie *Gastrotheca sp.*

Especie de anuro relativamente grande, cuyo tamaño varía entre los 29 y 57 milímetros, la coloración obedece a un patrón que va desde el café, dorado, verde e incluso rojizas y por lo general brillantes y muy llamativas, el vientre es pálido y de color uniforme, la cabeza es ancha con ojos grandes y saltones donde se caracteriza el iris con reticulaciones negras, los dedos terminan en discos grandes para la movilización (Figura 1); se la consideraba como *Gastrotheca litonedis*, pero en la actualidad está considerada como una especie pendiente de descripción taxonómica (Siavichay et al, 2016).



Figura 1. Rana especie *Gastrotheca sp.*
Fuente. (Siavichay et al, 2016).

El hábitat característico es de vegetación alta como bosques y matorrales y se han descrito en chacras y huertas que estén asociadas a pozos de agua; las hembras grávidas descansan en pequeños nidos cerca de la vegetación y tanto el macho como la hembra de esta especie guardan los huevos fecundados en un saco en la espalda que se lo conoce con el nombre de marsupio (Figura 2); la hembra de esta especie mantiene los huevos en el marsupio hasta que estos eclosionan, entonces busca pozos de agua sin movimiento en donde deposita las larvas o renacuajos para que puedan completar la metamorfosis (Siavichay et al, 2016).



Figura 2. Hembra de *Gastrotheca sp.* con huevos en el marsupio
Fuente. (Siavichay et al, 2016).

Se alimentan de pequeños insectos como grillos, polillas, arañas y saltamontes en su estado adulto, los renacuajos en cambio al desarrollar su vida dentro del agua se alimentan de las algas, plantas acuáticas y larvas de insectos que se encuentran en las pozas de agua (Siavichay, Maldonado & Mejía, 2016).

En los últimos años se estudia una especie (*Gastrotheca sp.*) que vive a elevaciones por encima del límite superior del bosque nublado, que se



diferencian por la longitud relativa de sus dígitos, textura de la piel, coloración y canto nupcial. A pesar de tener un rango de distribución altitudinal entre los 2000 y 3300 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), la nueva especie es más abundante a elevaciones entre 2400–2800 m.s.n.m., y al encontrarse en ciertas localizaciones de la provincia del Azuay se puede considerar endémica del sur del Ecuador. (Duellman et al, 2011) (Siavichay et al, 2016).

2.1.4.1.2. Estudios Especie *Gastrotheca sp.*

No se han realizado a la fecha estudios con ranas de la especie *Gastrotheca sp.* debido principalmente a la poca información que existe al respecto y a lo dificultoso que es encontrar esta especie que ha sido reportada en ciertos lugares de los andes de Ecuador (Duellman et al, 2011; Lomas & Trujillo, 2011).

Hace pocos años se revisaron las características más notorias de la morfología de la rana marsupial azuaya hasta ese momento conocida como *Gastrotheca litonedis*, encontrando rasgos propios de esta especie diferentes a los documentados en la especie en donde se encontraba clasificada, por lo que se la considera como una especie nueva y pendiente de una descripción taxonómica, que es como hasta el momento se la conoce (Siavichay, et al, 2016).

2.2 Agua

El agua es la sustancia esencial y vital por excelencia, debido a que permite la vida en el planeta y resulta impensable el desarrollo de todos los seres vivos sin la presencia de este elemento; se la considera como la sustancia más abundante del mundo, de hecho un 70% de la superficie de la Tierra está cubierta de agua en estado líquido, y un 95% de la atmósfera contiene agua en forma de vapor; participando en procesos tan básicos como la hidratación de los mamíferos, fotosíntesis de los vegetales o ser el vehículo para el transporte de nutrientes a la mayoría de seres vivos, hasta participar como catalizador fundamental en complejos ciclos bioquímicos en microorganismos y organismos más desarrollados para permitir procesos vitales o incluso ser el medio en donde seres vivos acuáticos desarrollan la vida (Berner, 1987).



Un punto muy importante a considerar es la contaminación del agua por elementos extraños ajenos al líquido vital, ya que desde el punto de vista físico químico este elemento constituye el solvente universal en el cual se disuelven una infinidad de sustancias que pueden resultar inofensivas para los procesos que se desarrollan en el agua o pueden afectar gravemente tanto la pureza de la misma, así como ocasionar alteraciones importantes en los ecosistemas acuáticos, con todas las consecuencias que este problema conlleva (Berner, 1987).

Por esta y más razones se ha trabajado para encontrar valores de referencia para monitorizar continuamente, controlar y limitar de cierta manera la presencia de ciertos elementos extraños a los ecosistemas acuáticos que pudieran alterar el comportamiento normal de los cuerpos de agua; sin embargo esta tarea resulta compleja debido a que el metabolismo propio de especies presentes en estos hábitats, el aumento de actividades antropogénicas y demás factores externos llevan a una proliferación exagerada de sustancias extrañas que exigen en los analistas cada vez mayor pericia para evitar que las mismas resulten un problema para el normal desarrollo y funcionamiento del agua y los ecosistemas acuáticos (Berner, 1987).

2.2.1 Calidad de agua

Se entiende como calidad de agua a las condiciones que presenta el medio objeto de estudio para brindar un estado óptimo en donde se pueda desarrollar la vida y garantizar que los valores numéricos físico-químicos, biológicos y factores externos de contaminación estén dentro de los límites permisibles en la normativa nacional vigente para el normal desarrollo de determinada actividad (Pauta, 2014).

El objetivo de analizar la calidad de agua es determinar cuáles son los parámetros que se encuentran alterados y predecir los problemas podrían causar la alteración de dichos parámetros en el normal desarrollo de una actividad; en el caso del presente estudio, se busca encontrar que factores presentes en el agua de las pozas implementada por el GAD municipal en la ciudad de Cuenca alterarían el normal desarrollo, reproducción y supervivencia de la especie de rana *Gastrotheca sp.*



El presente estudio se fundamenta en otros realizados previamente, debido a que se han realizado numerosos ensayos en donde se determina la calidad de diferentes cuerpos de agua medida en parámetros físico-químicos para la determinación de los riesgos toxicológicos de algunos compuestos encontrados en el agua sobre las especies que están directamente expuestas (Matthias & Moreno, 1983; Torres et al, 2009).

Las alteraciones en el desarrollo de un organismo a causa de la calidad de agua depende principalmente de la especie que se está estudiando, sin embargo hay ciertos parámetros comunes que se deben tomar en cuenta, así como valores referenciales que se proponen en las normativas ambientales a los que los estudios deben regirse para realizar los análisis correspondientes (Aguilera et al, 2016; TULSMA, 2010).

2.2.1.1 Indicadores de calidad de Agua

Se denominan indicadores de calidad de agua a aquellos parámetros o valores que sugieren o proporcionan información del agua que se esté analizando; para estas evaluaciones diferentes organizaciones de distintas nacionalidades han considerado que la implementación de índices de calidad medidos en base de parámetros físico-químicos y microbiológicos principalmente daban información certera del estado de un cuerpo de agua en estudio y se los denomino Índice de Calidad de Agua o por sus siglas ICA (Urgilez, 2016).

El Índice de Calidad de Agua (ICA), calcula mediante una expresión matemática, el estado de un cuerpo de agua, tomando en cuenta tres aspectos fundamentales que son los factores físico-químicos que se refiere a las concentraciones, especies químicas y tipos de sustancias orgánicas e inorgánicas presentes en el agua, los factos biológicos que toma en cuenta el estado y la composición de la biota acuática y los factores no acuáticos que son aspectos externos al sistema acuático en estudio (Urgilez, 2016).

Si bien hay muchos factores que influyen en la calidad del agua hay algunos más importantes que influyen directamente en el normal desarrollo de los anfibios en cautiverio, a continuación se enumeran los más importantes desde el punto de vista de la normativa técnica ambiental ecuatoriana en el apartado



titulado “Criterios de calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario” (Beamonte et al, 2004; Sardiñas et al, 2006; TULSMA, 2010).

2.2.1.1.1 Indicadores Físicos

Se refiere a aquellos elementos, especies químicas o tipos de sustancia orgánicas o inorgánicas que estando presentes en el agua que se analiza van a producir alteraciones (Urgilez, 2106).

2.2.1.1.1.1 Potencial de Hidrógeno o pH

El potencial de Hidrógeno o pH expresa la intensidad de un ácido, medida en función de la concentración de iones hidronio (H^+) en una escala logarítmica, y va a depender de la capacidad de disociación, así como de la concentración del mismo; dentro de un ecosistema acuático es un parámetro fundamental a considerar para determinar la especiación química y predecir en cierta medida la solubilidad de una o varias sustancias orgánicas e inorgánicas en el agua (Massol, 2000).

Los Valores Referenciales según “Criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulces frías o cálidas, en aguas marinas y de estuarios”, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA son: 6, 5 a 9, 5 (TULSMA, 2010).

2.2.1.1.1.2 Temperatura

Se define como la cantidad de calor o energía que existe dentro de un sistema termodinámico; en el caso del presente estudio de un ecosistema acuático; la variación de temperatura modifica el ambiente de desarrollo de la flora, fauna y eleva considerablemente el potencial tóxico de ciertos elementos o sustancias disueltas en el cuerpo de agua; además regula procesos vitales para los organismos vivos y afecta las propiedades físicas, químicas y físico-químicas de otros factores abióticos en un ecosistema (Massol, 2000; Samboni et al, 2007; Pauta, 2014).



Los Valores Referenciales según los “Criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulces frías o cálidas, en aguas marinas y de estuarios”, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA son en condiciones naturales: $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (TULSMA, 2010).

2.2.1.1.1.3 Conductividad

Se la puede definir como un parámetro físico-químico que mide la capacidad de una solución acuosa para transmitir corriente eléctrica, además indica la concentración de sales ionizadas; en un cuerpo de agua normal en donde se va a tener presencia de minerales provenientes del suelo además de cierta corriente o flujo de agua y la presencia normal de agua lluvia las sales que se van a encontrar con mayor frecuencia son: cloruros, sulfatos, bicarbonatos y nitratos, asociados a minerales o cationes comúnmente encontrados en el suelo adyacente como son: sodio, potasio, magnesio, calcio, etc (Massol, 2000; Pauta, 2014).

No contiene valores referenciales en la sección del TULSMA referente a “Criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulces frías o cálidas, en aguas marinas y de estuarios”, sin embargo resulta fundamental la realización de este análisis para observar producción de sales por el metabolismo propio de flora y fauna acuática y para tener una idea inicial del grado de eutrofización que puede llegar a tener una poza o ecosistema acuático (Massol, 2000).

2.2.1.1.2 Indicadores Químicos

Son elementos o sustancias cuya presencia, ausencia, aumento o disminución en la concentración en un ecosistema acuático indica que existe una alteración a tomar en cuenta (Urgilez, 2016).

2.2.1.1.2.1 Oxígeno Disuelto

El oxígeno disuelto es un indicador fundamental para determinar la calidad del agua debido a que la mayoría de elementos presentes en un ecosistema acuático van a necesitar de oxígeno para el normal metabolismo y desarrollo;



dependiendo de la concentración de oxígeno presente en el agua el sistema se clasificaría como aerobio o anaerobio y se encuentran estrechamente relacionados la concentración de oxígeno disuelto en el agua con factores externos como la temperatura, presión atmosférica y con factores intrínsecos del ecosistema como la cantidad de flora y fauna presentes en el cuerpo de agua (Figuroa et al, 2003).

Se considera la concentración de oxígeno disuelto como condición fundamental para el normal desarrollo de vegetación y fauna de un cuerpo de agua y además de factores externos e internos mencionados anteriormente la concentración de oxígeno dependerá también de los procesos de producción primaria y descomposición de materia orgánica (Figuroa et al, 2003; Pauta, 2014).

Los Valores Referenciales según “Criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulces frías o cálidas, en aguas marinas y de estuarios”, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA son: No menor a 5mg/L (TULSMA, 2010).

2.2.1.1.2.2 Nitratos

Los nitratos son indicadores claves de la contaminación de un cuerpo de agua, son de origen netamente químico, debido a que constituye la forma más oxidada de compuestos nitrogenados, los cuales se pueden producir por factores externos como una contaminación con fertilizantes usados en cultivos adyacentes o por factores internos como el metabolismo normal de las especies que habitan en el ecosistema, principalmente por producción de materia orgánica y por procesos de eutrofización, lo que constituye un verdadero problema para los organismos acuáticos debido a que su sistema digestivo tiene enzimas que reducen estos compuestos nitrogenados a nitritos causando afecciones graves en organismos expuestos como hipoxia, asfixia y muerte (Cabrera et al, 2003; Samboni et al, 2007; Pauta, 2014).

Los Valores Referenciales según “Criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulces frías o cálidas, en aguas marinas



y de estuarios”, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA son: hasta 10mg/L (TULSMA, 2010).

2.2.1.1.2.3 Nitritos

Es un indicador netamente químico proveniente de la reducción de compuestos nitrogenados que demuestra una producción importante de materia orgánica en los ecosistemas acuáticos; se considera la forma más común de contaminante derivado del nitrógeno encontrado en aguas tanto residuales, eutrofizadas o aquellas que contienen una importante cantidad de organismos; la concentración elevada de nitritos afecta directamente el desarrollo y supervivencia de las especies que habitan en los cuerpos de agua, ya que desde el punto de vista toxicológico se ha documentado las sales de nitritos como potencialmente tóxicos para organismos acuáticos (Muñoz et al, 2004; Samboni et al, 2007; Pauta, 2014).

Es llamativo en las hojas de seguridad de las sales de nitrito, en especial aquellas de nitrito de sodio, la presencia de un pictograma que advierte que esta sal es muy tóxica para organismos acuáticos; de hecho en estudios ecotoxicológicos realizados con nitritos sobre algunos de los principales organismos indicadores se ha obtenido resultados contundentes; para la trucha arcoíris de tiene una CL50 de 0,19mg/L en 96 horas de ensayo, para la especie *Daphnia magna* se tiene una CE50 que va desde 12,5 a 100mg/L, así mismo estudios realizados en organismos terrestres como la rata en donde se observa que la DL50 es de 85mg/kg de peso corporal (Grupo Transmerquin, 2014; Merck, 2015; Roth, 2016).

La toxicidad de las sales de nitritos en lo referente al ser humano radica en la capacidad de este compuesto de formar ácido nitroso a un pH ácido que se pueden combinar con las aminas secundarias, formando compuestos llamados nitroso-aminas que han sido reportadas como potenciales cancerígenos, lo que exige un control mucho más exhaustivo en medios donde posiblemente se pueda encontrar este compuesto (Pauta, 2014).

Los Valores Referenciales según los “Criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulces frías o cálidas, en aguas marinas



y de estuarios” inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA son: Hasta 0,6mg/L (TULSMA, 2010).

2.2.1.2 Requerimientos Anfibios en cautiverio

La cantidad y la calidad de agua son consideraciones fundamentales y están entre los factores más importantes para ayudar en la supervivencia de anfibios (Yanez et al, 2014). A diferencia de los reptiles, los anfibios no tienen huevos con cáscara. Sus huevos relativamente desprotegidos son esencialmente parte del ambiente acuático y el embrión en desarrollo está sujeto a cualquier problema relacionado con la calidad del ecosistema acuático; los anfibios quizá sean más sensibles a la calidad del agua que muchos peces (Reforesta, 2007).

Los anfibios no beben agua por su boca sino que absorben la que necesitan a través de su piel permeable; en anuros la absorción de agua se hace principalmente a través de los denominados “parches de absorción,” localizados en la parte posterior del abdomen. También absorben una parte significativa de oxígeno a través de su piel y si esta se seca, las ranas perderán la habilidad de intercambiar gases a través de la misma y se sofocarán (Coppo, 2003; Yáñez, 2005, Quishpe, 2016).

Desafortunadamente, las adaptaciones asombrosas y los fuertes vínculos al ambiente acuático también significan que los anfibios sean particularmente sensibles a los cambios en la cantidad y calidad del agua (Coppo, 2003).

La obtención de valores referenciales para el agua de los hábitats creados artificialmente para el desarrollo de una especie se considera muy difícil de determinar (Poole & Grow, 2008), es así como normativas como el TULSMA establece valores referenciales o límite para cuerpos de agua que se usa para especies criadas en cautiverio en general, ya que resulta imposible hacerlo para cada especie de forma particular (TULSMA, 2010); Gabriela Agostini en su estudio titulado “Ecotoxicología de Anfibios en agroecosistemas de noreste de la región Pampenea” describe la dificultad de documentar valores referenciales para calidad de agua en hábitats artificiales debido a que cada especie tiene sus requerimientos particulares y depende de muchos factores internos y externos adicionales (Agostini, 2013).



2.3 Contaminantes derivados del Nitrógeno

Para el medio ambiental que es objeto del presente estudio, se considera que las formas de nitrógeno que pueden contaminar los cuerpos de agua y resultan tóxicas en cierta medida son los nitratos, los nitritos, nitrógeno amoniacal y nitrógeno orgánico; cada una con sus respectivas características y grado de toxicidad (Pauta, 2014).

2.3.1 Efecto Nitrógeno en Hábitats de anfibios

En los ecosistemas acuáticos se observa que los autores coinciden en manifestar que el nitrógeno es un elemento altamente tóxico, además de ser el elemento al que se le atribuye en gran medida el declive de las poblaciones de anfibios (Marco, 2002; Fioranelli et al, 2005); se plantea incluso el desarrollo de algunas alternativas para disminuir los niveles de nitrógeno y la toxicidad de los nitritos como la utilización de cloruro de sodio en los hábitats de anfibios, que mitiguen en cierto grado los efectos nocivos de estos compuestos en el agua (Shinn et al, 2013).

Para determinar la toxicidad del nitrógeno frente a la poco estudiada especie de rana marsupial azuaya *Gastrotheca sp.* se plantea un bioensayo de toxicidad de esta especie con concentraciones elevadas al nitrito de sodio, como se lo realizó en estudios previos con otras especies con anfibios (Kerry & Griffis, 2005; Kerry & Griffis, 2007); Otro autor Marco (1999), estudió también el comportamiento y metamorfosis de la rana de cascada sometida a concentraciones ascendentes de nitrito de sodio, encontrando que a niveles de 3.5ppm había efectos significativos, datos que en cierta medida coinciden con los obtenidos por Kerry & Griffins quienes estudiaron el efecto subletal que podría producir el nitrito en especies de anfibios como la rana selvática y en salamandra obteniendo valores de mortalidad por sobre las 6.1ppm.

Si bien estos datos nos dan valores que se pueden utilizar de referencia para elaborar un estudio se debe considerar que va a depender mucho de la especie como se observa en el estudio desarrollado por (Izaguirre, 2006; Ramírez, 2015) que encuentra valores variables en la cantidad de piretroides respecto a la mortalidad de *Physalaemus biligonigerus* y *Bufo arenarum*; o a los datos



obtenidos por Alonso (2016) en el estudio de la toxicidad de nitritos frente a *Eulimnogammarus toletanus* y *Polycelis felina*, que con valores similares produjeron una toxicidad aguda de 96 horas al igual que en el estudio de (Alea, 2003) que probó toxicidad de sulfato de cobre en rana cubana *Osteopilus septentrionalis*.

2.4 Ecotoxicología

Se denomina ecotoxicología al estudio de contaminantes del medio ambiente y a diferencia de la toxicología ambiental que estudia las dosis de los tóxicos sin efecto y se la observa más como una ciencia de seguridad, la ecotoxicología se define según Sanz Sánchez (1974) como “la ciencia que estudia la polución, su origen, evolución e interacciones con las moléculas que integran dinámicamente los ecosistemas, sus acciones y efectos sobre los seres vivos que forman estos ecosistemas, con su evaluación, como determinantes de criteriología y profilaxis biológica y socio-económica”; por lo que se puede observar como una ciencia que abarca un criterio mucho más amplio de la dosis de contaminantes y su efecto en el medio ambiente (Capó Martí, 2007).

En los últimos años se han descrito algunos procesos que se pueden considerar como potenciales contaminantes ambientales según el impacto, entre ellos los más importantes son: el efecto invernadero, la acidificación, la destrucción del ozono estratosférico, la formación de smog, la eutrofización, toxicidad humana y ecotoxicidad; cada uno con sus características diferenciales en lo referente al mecanismo de acción por el que ejercen su toxicidad, pero con un factor en común que es la introducción de sustancias o elementos tóxicos al ecosistema (Capó Martí, 2007).

2.4.1 Eutrofización

Se trata de un proceso contaminante del medio ambiente que significa literalmente “enriquecimiento con nutrientes”; y aunque la presencia de este fenómeno en los ecosistemas acuáticos es esencial para la conservación y desarrollo de la vida de algunas de las especies que habitan en los cuerpos de agua natural, cuando la eutrofización es excesiva provoca serios problemas por



lo que requiere de un minucioso control para mantener la concentración de estos nutrientes dentro de los límites deseables (Capó Martí, 2007).

La eutrofización se produce por descarga de elementos de origen inorgánico como los nitratos o fósforo principalmente, por descarga de sustancias orgánicas como las vitaminas, por el paso de compuestos como los fertilizantes provenientes de cultivos adyacentes o por cualquier mecanismo natural o artificial que de una u otra manera introduzca nutrientes en lagos, charcas o cualquier ecosistema acuático, produciendo en el mismo un florecimiento anormalmente excesivo, que en un principio oxigenan el agua mediante el proceso de fotosíntesis, pero a medida que los nutrientes se terminan las algas mueren y la concentración de oxígeno disminuye de manera drástica lo que lleva a una eliminación casi completa de la fauna natural de estos ecosistemas (Capó Martí, 2007).

Además, algunas de las algas mencionadas anteriormente van a producir toxinas en su metabolismo lo que acelera el proceso de eliminación de la fauna acuática; en el presente estudio hay que prestarle especial atención al proceso de enriquecimiento con nutrientes debido a que la creación de las pozas artificiales para la conservación de los anfibios se ha realizado cerca de las orillas de los ríos y con acceso al público en general, evitando que se pueda tener controlado en su totalidad factores que se presumen pudieran ser causantes del proceso de eutrofización y tomando en cuenta que se ha evidenciado en la mayoría de pozas un crecimiento acelerado de diversos tipos de algas en la superficie de los cuerpos de agua (Abad et al, 2017), el control físico-químico de los mismos se vuelve fundamental para el correcto mantenimiento de las mismas (Capó Martí, 2007).

2.4.2 Bioindicadores

Se denominan bioindicadores a los organismos o comunidades de organismos en los que su existencia, características estructurales, funcionamiento y reacciones dependen del medio en donde se desarrollen, por lo que se alterarán al modificar las condiciones ambientales como si se trataran de estímulos específicos, dando información importante tanto de los cambios



ocurrido es en ecosistema, así como de la intensidad del cambio ambiental ocurrido (Capó Martí, 2007).

La capacidad de respuesta que tienen los bioindicadores ante determinado cambio en las condiciones ambientales, va a depender de algunos factores como la composición genética que puede favorecer o no a la adaptación a los cambios y evidenciar una respuesta rápida, también dependerá de la etapa de desarrollo del organismo usado como bioindicador, debido a que hay fases en el ciclo de vida que son más influyentes y finalmente dependerá también de las propias condiciones ambientales que se presenten, ya que la cantidad de estímulos puede ser infinitamente variada y existir efectos aditivos, sinérgicos o potenciadores (Capó Martí, 2007).

Se han descrito diferentes maneras de clasificar a los bioindicadores; la manera más sencilla es de acuerdo a la susceptibilidad de los organismos a las condiciones ambientales del medio, en donde pueden ser muy sensibles, sensibles, poco sensibles y resistentes, dependiendo del grado de respuesta ante un estímulo determinado; también se los puede clasificar atendiendo al criterio de poder cuantificar las respuestas en donde la presencia, ausencia o abundancia en un ecosistema, indican los efectos de un factor ambiental de forma cualitativa, de esta manera la presencia o abundancia indican una respuesta positiva y la ausencia una respuesta negativa (Capó Martí, 2007).

La manera más eficiente de clasificación de los bioindicadores es de acuerdo a la forma de respuesta del organismo a un estímulo ambiental, en donde se puede hablar de organismos detectores a aquellos que viven naturalmente en un área y muestran respuestas como movilidad, capacidad de reproducción o mortalidad ante cambios ambientales; los organismos explotadores son aquellos que indican una probabilidad elevada de la presencia de una perturbación y aparecen repentinamente en forma abundante; los organismos centinela son bioindicadores muy sensibles que se introducen de forma artificial en un ecosistema y funcionan como alarma, ya que tienen la capacidad de detectar rápidamente los cambios relativamente pequeños; los organismos acumuladores son resistentes a ciertos compuestos al ser capaces de absorberlos y acumularlos en cantidades medibles; finalmente los organismos



usados para bioensayos, que son aquellos que se pueden utilizar in vitro como un reactivo y ayuda a detectar la presencia y concentración de un determinado tóxico en un ecosistema (Capó Martí, 2007).

Los bioindicadores test o bioensayo tienen la característica de ser bastante sensibles, pudiendo ser plantas o animales usados para detectar la presencia de contaminantes y su concentración, el uso más frecuente de estos bioindicadores es establecer listas de contaminantes y clasificarlos según su toxicidad (Capó Martí, 2007).

En el presente estudio se hace uso de los bioindicadores para detectar a que niveles de nitrito de sodio existe mortalidad en anuros de la especie *Gastrotheca sp.* en ecosistemas acuáticos creados artificialmente

2.4.2.1 Anfibios como bioindicadores

El incremento de las investigaciones acerca de la descripción y necesidades de los anfibios en los últimos 30 años muestra el interés por estas especies y la necesidad de continuar con estos estudios ya que existen especies en proceso de descripción y todavía muchas están por describirse. Un factor fundamental de su estudio radica en la sensibilidad de estas especies a los cambios en el ecosistema principalmente a la presencia de tóxicos y contaminantes, cumpliendo con el rol de especies indicadoras o bioindicadoras (Amador Oyola, 2016).

La totalidad de autores manifiestan que las ranas son perfectas para observar el desarrollo de un ecosistema ya que son bioindicadores óptimos para identificar posibles contaminantes presentes en el agua, sin embargo por esa misma susceptibilidad que tienen a los tóxicos hace que sea muy difícil la identificación concreta de un tóxico en particular capaz de provocar daño o alteración en su ciclo de vida (Alea, 2004; Rice et al, 2014).

Si bien se ha establecido con certeza que los anfibios resultan ser extremadamente sensibles a contaminantes presentes en el ambiente y demuestran el estado en el que se encuentra determinado ecosistema, la experimentación se vuelve difícil, debido a que de forma aguda los anfibios no son mucho más sensibles que los grupos de animales comúnmente utilizados



como indicadores de contaminación y prácticamente exigen un estudio más detallado in vitro para observar efectos crónicos que se pueden producir a largo plazo (Baez et al, 2013).

2.4.3 Bioensayos de Toxicidad

Los Bioensayos son empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. En los bioensayos se usa un tejido vivo, organismo, o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia (Poi de Nieff, 2000; Silva et al, 2003).

Generalmente los contaminantes en el ecosistema suelen actuar mezclados ya que entre ellos existen interacciones y la determinación por medios químicos no aclaran los posibles efectos biológicos sobre los organismos estudiados, sin embargo en un bioensayo de toxicidad se controlan con minuciosidad las condiciones ambientales para que la respuesta de un organismo de prueba ante tóxicos determinados se pueda definir inequívocamente; sin embargo la extrapolación de los resultados obtenidos in vitro en el bioensayo a situaciones reales pueden generar ciertos cambios o confusiones, por lo que no se debe excluir las observaciones en el campo o los ensayos in situ si se desea comprender por completo las repercusiones de un problema de contaminación ambiental (Capó Martí, 2007).

Para la elección de un espécimen en la realización de un bioensayo es necesario tomar en cuenta algunos factores según (Capó Martí, 2007); primeramente el organismo debe ser sensible a algunos factores ambientales principalmente a aquellos que se quiere probar en el ensayo, la distribución de la especie de ser amplia y estar disponible en cantidad suficiente, la especie elegida debe tener una importancia económica, recreativa o ecológica desde el punto de vista local o nacional, las condiciones de cultivo deben ser fáciles de replicar a nivel de laboratorio, debe estar en perfectas condiciones de salud, es decir libre de parásitos o enfermedades y finalmente debe ser compatible con las técnicas del bioensayo.



2.4.3.1 Bioensayos en Anfibios

Existen organismos de elección propios para la determinación de tóxicos en determinado medio; en el caso de ecosistemas acuáticos se cuenta con especies blanco o diana en donde realizar ensayos como *Daphnia magna* o la trucha arcoíris que debido a sus propiedades son denominados animales centinela y se los utiliza para evidenciar cambios en el medio en donde habitan que se los puede atribuir directamente a la presencia de compuesto ajeno con propiedades tóxicas (Capó Martí, 2007).

La utilización de bioensayos de toxicidad con especies de anfibios no es muy común y se los realiza con mayor frecuencia para determinar la susceptibilidad de estas especies a un tóxico que se sospecha puede afectar su supervivencia o desarrollo más que para determinar la toxicidad de algún compuesto potencial contaminante de un ecosistema acuático; sin embargo se deben realizar estos análisis porque no se pueden extrapolar los resultados encontrados en otros organismo a especies de anfibios ya que se va tener considerables diferencias en los resultados (Izaguirre et al, 2006).

Cuando en un ecosistema se localiza un compuesto del que se conoce su potencial toxicológico, es importante determinar el grado de afección en las especies que desarrollan su vida en el mencionado ecosistema para poder predecir los posibles efectos y encontrar una solución efectiva en caso de ser necesario (Capó Martí, 2007); en el caso del presente estudio se estudiaron las condiciones físico-químicas de hábitats artificiales creadas con motivos de conservación de la especie de rana marsupial azuaya *Gastrotheca sp.* y se encontró una importante concentración de especies derivadas de nitrógeno en el agua de las pozas, esto exige desde el punto de vista ecológico y de conservación la realización de un bioensayo en donde se pruebe los posibles efectos tóxicos de los nitritos que son la especie de nitrógeno más comunes sobre la especie *Gastrotheca sp.*

En la ciudad de Cuenca, se desarrolló un estudio en el cual se verificó por medio de cambios en la iluminación, temperatura y dieta la disminución de mortalidad en especies de rana *Gastrotheca sp.*, conocida hasta ese momento como *Gastrotheca litonedis*, en el cual se verifica además de una gran



resistencia del anfibio a los cambios en su medio ambiente, una gran capacidad de desarrollarse en cautiverio, por lo que es ideal para el tipo de estudios en donde se utilizan tóxicos y se requiere que factores externos no afecten la investigación (Arbeláez, 2014); estos datos coinciden con las conclusiones a las que se llega en el estudio realizado por el zoológico bioparque AMARU y otros investigadores independientes que coinciden en manifestar la gran capacidad de adaptabilidad de la especie *Gastrotheca* a los hábitats urbanos formados artificialmente o a los pequeños espacios naturales que quedan dentro de la urbe en donde se ha evidenciado individuos de esta especie desarrollándose de manera efectiva (González, 2011; AMARU, 2013).



Capítulo III

Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis Generales

- Los parámetros físico-químicos de calidad del agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.* en Cuenca, cumplirían los criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulce, fría o cálida, en aguas marinas y de estuarios, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA.
- El porcentaje de mortalidad de las larvas de *Gastrotheca sp.* estaría directamente relacionado con el nivel de concentración de nitrito de sodio en el agua.

3.1.2 Hipótesis Específicas

- Las larvas de *Gastrotheca sp.* en agua con concentraciones de Nitrito de Sodio superiores a 80mg/L presentarían una mortalidad del 100%.
- Las larvas de *Gastrotheca sp.* en agua con concentraciones de Nitrito de Sodio inferiores a 0,6mg/L presentarían una mortalidad del 0%.
- Los valores de pH, conductividad, oxígeno disuelto, temperatura, nitritos y nitratos del agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.* estarían dentro de los valores de referencia requeridos para la preservación de flora y fauna inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivos Generales

- Evaluar los parámetros físico-químicos de calidad del agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.* en



Cuenca, en función de los criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulce, fría o cálida, en aguas marinas y de estuarios, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA.

- Determinar el porcentaje de mortalidad de larvas de la especie *Gastrotheca sp.* en medios acuáticos con diferentes concentraciones de Nitrito de Sodio.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar los valores de pH, conductividad, oxígeno disuelto, temperatura, nitritos, nitratos y oxígeno disuelto del agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.* en función de los criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulce, fría o cálida, en aguas marinas y de estuarios, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA.
- Determinar el porcentaje de mortalidad, la concentración letal media, el NOAEC y LOAEC de las larvas de la especie *Gastrotheca sp.* sometidas a diferentes concentraciones de Nitrito de Sodio en un medio acuático.



Capítulo IV

Materiales y Métodos

El presente estudio plantea el análisis de los principales parámetros de la calidad de agua que pudiesen afectar el normal desarrollo de la especie de rana *Gastrotheca sp.* en pozas creadas artificialmente que han sido diseñadas para garantizar su supervivencia, desarrollo y reproducción normal, en base a los criterios de calidad de agua para la preservación de flora y fauna en agua dulces frías o cálidas, en aguas marinas y de estuarios, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA, además de la realización de un bioensayo para determinar la toxicidad de los nitritos en esta especie de anfibio.

4.1 Tipo de Estudio

El estudio realizado involucra análisis de las variables físico-químicas, es una investigación de campo, observacional, de tipo descriptivo, prospectivo de corte longitudinal y experimental.

Con respecto al bioensayo toxicológico, se trata de una investigación experimental de corte transversal de tipo aleatorio controlado.

4.2 Área de Estudio

La investigación se desarrolla en la zona urbana del cantón Cuenca, provincia del Azuay, ubicada en la zona sur del Ecuador; entre las características físicas de la urbe se puede destacar la altitud que varía entre los 2.400 y 2.500 metros sobre el nivel del mar, tiene un clima que se lo puede considerar entre templado y cálido, dependiendo de la época del año; la temperatura promedio es de 15°C (Abad et al, 2017).

Desde el punto de vista geográfico Cuenca se localiza en el valle de los Andes, la ciudad ha mostrado un notorio crecimiento y expansión en todas las direcciones, con la consecuente intervención de algunos hábitats naturales de especies endémicas entre las cuales se pueden destacar también algunos anfibios que como se detalla en observaciones (Siavichay et al, 2016), se han



adaptado a la urbanización; este aspecto resulta fundamental ya que la ciudad de Cuenca tiene una extensión urbana aproximada de 7800 hectáreas con un número de habitantes aproximado de 331000, según últimos datos registrados de censos (Abad et al, 2017; INEC, 2010).

La presente investigación incursiona dentro del proyecto denominado “Conservación de la Biodiversidad Silvestre en el Área Urbana de Cuenca”, liderado por la Comisión de Gestión Ambiental del GAD Municipal de Cuenca, en la Tabla 1 se detalla el área de estudio dentro del casco urbano, donde se construyeron 10 hábitats artificiales para la conservación de especies de anfibios amenazados.

Tabla 1. Ubicación de hábitats artificiales implementados para la conservación de anfibios por el GAD municipal de Cuenca.

Sector	Código	Localidad	Coordenadas	
			X	Y
Yanuncay	YAN1	Paseo 27 de Febrero	720492	9678169
Yanuncay	YAN2	Sector de la Fundación Humanitaria Sonrisas con Amor	720253	9678199
Yanuncay	YAN3	Sector Puente del Arco. Cerca de la Ave. Loja	719522	9678546
Tomebamba	TOM1	Sector Puertas del Sol	718693	9680307
Tomebamba	TOM2	Sector Quebrada Sacay-Urbanización los Cerezos	717943	9680468
Tarqui	TAR1	Sector Circo Social junto a quebrada	719304	9677135
Tarqui	TAR2	Sector Circo Social junto a parqueadero	719093	9676992
Tarqui	TAR3	Sector Circo Social junto a canchas	718953	9676936
Paraíso	PAR1	Parque El Paraíso	723610	9678201
Paraíso	PAR2	Parque El Paraíso junto a caminera	723882	9678341

4.3. Método de Análisis de Variables

De la presente investigación se puede obtener dos categorías de las cuales se desprenden un grupo de variables para cada categoría, las primeras de calidad físico química del agua, en donde se enumera los parámetros que se analizan y las segundas del bioensayo toxicológico, en donde se describen los datos

que se van a obtener a partir del estudio; La descripción respectiva de cada una se puede apreciar en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción de la metodología usada para la determinación de las variables analizadas en la presente investigación.

Categoría	Variable	Descripción Método de Análisis
Calidad Físico Química del agua	pH	Se utilizó un electrodo estándar de hidrógeno de vidrio con un electrodo de referencia.
	Conductividad	Medida directa de la conductividad utilizando una celda de conductividad previamente estandarizada con una solución patrón (generalmente KCl).
	Oxígeno Disuelto	Medido mediante la tasa de difusión del oxígeno molecular a través de una membrana plástica permeable al oxígeno, que recubre el elemento sensible de un electrodo en donde la "corriente de difusión" es lineal y directamente proporcional a la concentración del Oxígeno Disuelto.
	Temperatura del Agua	Medición realizada con un termómetro de mercurio calibrado en grados centígrados, procedimiento realizado in situ en cada poza.
	Nitritos	El nitrito en la muestra reacciona el ácido sulfanílico para formar una sal de diazonio intermedia. Esta se acopla al ácido cromotrópico para producir un complejo de color rosa directamente proporcional a la



		cantidad de nitrito presente que es leído en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 507nm.
	Nitratos	El cadmio metálico reduce a nitritos los nitratos de la muestra. El ion de nitrito reacciona en un medio ácido con el ácido sulfanílico para formar una sal intermedia de diazonio. Esta sal se une al ácido gentísico para formar un producto de color ámbar directamente proporcional a la cantidad de nitrato presente en la muestra y que es leído en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 500nm.
Bioensayo Toxicológico	Concentración de Nitrito de Sodio	Colocada mediante diluciones a partir de una solución madre de 100 y 1000ppm dependiendo el caso.
	Mortalidad de Larvas de <i>Gastrotheca sp.</i>	Se consideró aquellas larvas en las que se veía una muerte real, no solamente aquellas en un estado de inconciencia o letargo.

4.4 Muestreo

La muestra de agua para el análisis de los parámetros físico químicos se tomó directamente en las diez pozas implementadas por el GAD municipal de Cuenca; cada sensor fue colocado a la misma profundidad, para la determinación de la concentración de nitritos y nitratos se tomó la muestra en cada poza en un recipiente limpio y seco, se realizó el análisis en no más de 5 horas después de tomada la muestra, ya que pasado este tiempo puede existir

procesos de oxidación o reducción, alterando los resultados del análisis, para obtener una muestra significativa se recolectó al menos 100ml para el análisis (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1998; Abad et al, 2017).



Figura 3. Toma de muestra de agua para análisis en laboratorio.

4.4.1 Frecuencia de Muestreo

Para obtener los datos de las variables fisicoquímicas se realizaron 12 monitoreos, con una periodicidad de uno semanal; la recolección de muestras se efectuó semanalmente en dos días consecutivos, muestreando cinco pozas por día (Abad et al, 2017).

Para el muestreo de las larvas de la especie *Gastrotheca sp.* se escogieron larvas en las que se veía una gran movilidad, de tamaño y peso grande, en un estado de evolución de 23 a 27 semanas de un gran grupo de especímenes que se crían en cautiverio en el Centro de Conservación de Anfibios (CCA) del zoológico bioparque Amaru; el muestreo se lo realizó en un período de 24 horas, donde se colocó a los individuos en los terrarios que contenían agua destilada libre de sustancias extrañas, luego para la adaptación se tomó 24 horas previas al desarrollo del bioensayo toxicológico.

4.4.2 Ficha de muestreo

Según Norma NTE-INEN 2176 (1998): “Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo”, en su punto número 7 se indica el proceso para identificación y registros de las muestras.

Dentro del informe de muestreo deben incluirse los siguientes datos:



- a. Localización (y nombre) del sitio del muestreo, con coordenadas (lagos y ríos) y cualquier información relevante de la localización;
- b. Detalles del punto de muestreo
- c. Fecha de la recolección
- d. Método de recolección
- e. Hora de la recolección
- f. Nombre del recolector
- g. Condiciones atmosféricas
- h. Naturaleza del pretratamiento
- i. Preservante o estabilizador adicionado
- j. Datos recogidos en el campo. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1998; Abad et al, 2017)

4.5 Materiales y Equipos

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizaron materiales, equipos y reactivos de acuerdo a las normativas nacionales vigentes, los cuales se enumeren a continuación:

1. Para el análisis de la calidad de agua en lo referente a los términos de pH, Conductividad, Oxígeno Disuelto y Temperatura del Agua, se utilizó un equipo portátil HQD-HACH propiedad de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, para el análisis in situ y calibrado según la normativa; además para la limpieza de los sensores luego de cada medición se utilizó agua destilada.
2. En el análisis de las variables de los contaminantes del agua nitritos y nitratos, se utilizó un espectrofotómetro portátil con batería de ion litio recargable, el cual requiere reactivos específicos para su determinación; se utilizaron los modelos Nitriver 3 y Nitriver 5 de la marca HACH; este proceso requiere también de material de vidrio propio de un laboratorio, el cual fue facilitado por el Laboratorio de Análisis de Agua de la facultad de Ciencias Químicas a cargo del Dr. Geovanny Larriva.



3. Para efecto del bioensayo toxicológico con larvas de la especie *Gastrotheca sp.* se utilizaron peceras de vidrio o plástico de una capacidad de 5 litros; además se utilizó agua destilada libre de partículas extrañas que pudieran alterar el ensayo, este material fue otorgado por el Centro de Conservación de Anfibios (CCA) del zoológico bioparque Amaru a cargo del Blgo. Fausto Siavichay.
4. El tóxico utilizado para el desarrollo del bioensayo fue el Nitrito de sodio con calidad analítica de la marca Merck CAS 7632-00-0, que junto con material de vidrio para preparar las concentraciones ascendentes que requiere el ensayo fue facilitado por la bodega de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

4.6 Análisis de Variables

Como se mencionó anteriormente las variables se las puede dividir por categorías, aquellas que se clasifican dentro de los parámetros físico-químicos que son pH, conductividad, temperatura, oxígeno disuelto, nitritos y nitratos.

Todas las variables mencionadas anteriormente se analizaron mediante estadística descriptiva con el paquete Microsoft Excel 2013 y se expone los resultados en el capítulo 4.

Para el caso de las variables relacionadas con el bioensayo toxicológico estas pueden ser la mortalidad de las larvas de *Gastrotheca sp.* y la concentración del nitrito de sodio que se coloca en los diferentes terrarios; valores que darán resultados que se exponen con mayor claridad en la sección 3.6.4.

4.6.1 Determinación de pH, Conductividad, Temperatura del Agua, Oxígeno Disuelto

Las variables de pH, conductividad, temperatura del agua y oxígeno disuelto se realizaron in situ en las pozas implementadas por el GAD municipal de Cuenca, sin embargo en los últimos monitoreos se opta por realizar el análisis de estos parámetros en el laboratorio, lo cual no interfiere en los resultados; este método de análisis esta fundamentalmente basado en las especificaciones referidas en los “Métodos Estándar para análisis de Agua” (Abad et al, 2017).



4.6.2 Determinación de Nitritos y Nitratos

Para el caso de nitritos y nitratos se utiliza un espectrofotómetro portátil con batería de ion litio recargable, el cual requiere reactivos específicos para su determinación. Se utiliza el Nitriver 3 y Nitriver 5 de la marca HACH. El procedimiento consiste en filtrar la muestra con papel estándar, para evitar que las impurezas presentes en la muestra alteren el resultado; se separan 10 mililitros de muestra para cada variable y blanco, requiriendo 40 mililitros en total por muestra. Se coloca el reactivo que tras un tiempo de reacción permitirá leer en el equipo los resultados alcanzados (HACH, 2017)

Para el caso de los nitratos en agua el método consiste en la formación de un producto de color ámbar directamente proporcional a la cantidad de nitrato presente en la muestra, formado por la reacción del cadmio metálico que reduce a nitritos los nitratos de la muestra, el ion de nitrito reacciona en un medio ácido con el ácido sulfanílico para formar una sal intermedia de diazonio y esta sal se une al ácido gentsílico que es leído en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 500nm, basado en las especificaciones referidas en los “Standard Methods para análisis de Agua”, adaptados por la marca HACH® según el método 8039.

Con los nitritos el método consiste en la formación de un complejo de color rosa directamente proporcional a la cantidad de nitrito presente, formado por la reacción entre el nitrito de la muestra y el ácido sulfanílico para formar una sal de diazonio intermedia, esta se acopla al ácido cromotrópico que es leído en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 507nm, basado en las especificaciones referidas en los “Standard Methods para análisis de Agua”, adaptados por la marca HACH® según el método 8507.

Es importante aclarar que muestras con color elevado presentaron interferencia al momento de realizar el análisis, debiéndose encontrar las razones de este fenómeno en cada caso para reportarlo.

Se realizó además una caracterización rápida de la poza PAR2 debido a que interferencias en el agua no permitían determinar de forma normal la presencia de nitritos y nitratos, para lo cual se determinó la coloración a través de un colorímetro, la turbiedad a través de un turbidímetro, olor organolépticamente y



hierro por espectrofotometría en el mismo equipo de marca HACH® con el reactivo respectivo.

Todos estos datos se analizaron estadísticamente en el software Statistca® versión 13.3 mediante un test de ANOVA con factor de medidas repetidas.

4.6.3 Bioensayo toxicológico

La segunda parte del estudio se trató de un bioensayo de toxicidad aguda del nitrito de sodio frente a las larvas de *Gastrotheca sp.* el cual se lo realizó por en el laboratorio del Centro de Conservación de Anfibios (CCA) del zoológico bioparque Amaru.

Para el desarrollo del bioensayo toxicológico se requirió la implementación de terrarios que cumplieran la condición de ser diseñados para el normal desarrollo de las larvas, es decir imitar de la mejor manera un medio natural para el normal desarrollo de los individuos utilizados en la presente investigación, además de tener las mismas condiciones en el ensayo, las cuales fueron: el tener agua destilada limpia en el caso del blanco y en el caso de los terrarios con concentraciones de nitrito de sodio, las mismas se debían hacer en agua destilada en las mismas condiciones del blanco, se suspendió la alimentación durante la duración del bioensayo, se controló la temperatura y presencia de material extraño en los hábitats y se verificó diariamente las condiciones de las larvas durante la duración del ensayo, retirando inmediatamente las larvas que habían muerto en cada terrario.

4.6.3.1 Elección de la Población de Larvas de la especie *Gastrotheca sp.*

Se utilizaron larvas de rana *Gastrotheca sp.* en estadio 26-30 en la escala de Gosner; es decir aquellas que a pesar de tener un desarrollo importante, no han alcanzado todavía las estructuras necesarias para completar la metamorfosis; la elección fue realizada por los miembros del Centro de Conservación de Anfibios (CCA) del Zoológico Bioparque Amaru según los criterios expuestos anteriormente y escogiendo aquellas que al menos pertenezcan a la tercera generación obtenida en cautiverio para ser sacrificadas con fines científicos, los cuales previo al ensayo estuvieron 24



horas en los terrarios libres de concentraciones del tóxico para que se pudieran adaptar de una mejor manera a los nuevos hábitats .

Los terrarios fueron 12 hábitats para el desarrollo de 10 individuos en cada hábitat, para lo cual se necesitó el espacio adecuado, el volumen mínimo de agua fue de 5 litros por terrario para cumplir con estas características; el agua que se utiliza fue agua destilada 100% libre de cloro y sales que puedan alterar el estudio.

4.6.3.2 Procedimiento del bioensayo toxicológico con larvas de la especie *Gastrotheca sp.* frente a concentraciones ascendentes de nitrito de sodio

Se trabajó con 12 grupos de terrarios en los que se colocaron 10 individuos por grupo y concentraciones crecientes de nitrito de sodio 0; 0.3; 0.6; 1.2; 2.1; 4.6; 6.1; 10; 20; 40; 80 y 160 mg/L de nitrito de sodio y se verificó la mortalidad de los individuos cada día, así como cambios evidentes producidos en la morfología y fisiología, no se documentó problemas en la movilidad o comportamiento de los individuos, debido a que el presente estudio analiza exclusivamente la toxicidad aguda del Nitrito de Sodio en función de la mortalidad de las larvas de la especie *Gastrotheca sp.*

Los resultados obtenidos se los describe a partir del día 0, es decir cuando se coloca el tóxico en estudio hasta obtener la mortalidad del 100% de los individuos de un terrario, reportando los resultados obtenidos en términos de mortalidad de las larvas de *Gastrotheca sp.* cada 24 horas; según datos obtenidos en ensayos previos donde se analiza la toxicidad aguda de un determinado compuesto sobre una especie diana, se establece un tiempo de 96 a 120 horas para reportar los resultados del ensayo; finalmente se replica el bioensayo en las mismas condiciones del primero y se reportan los resultados como duplicado para obtener diferencias significativas entre los resultados de ambas pruebas y disminuir el margen de error al momento de establecer los valores que brinda el bioensayo toxicológico.

4.6.3.3 Uso del Método Log-Logístico Binomial

Se utilizó para el análisis de los datos obtenidos en el bioensayo toxicológico una curva dosis respuesta mediante el método estadístico Log-Logístico



Binomial que establece la relación entre dos variables en estudio, aplicando un paquete de datos llamado “dose response curve” drc diseñado para el software R versión 3.3. al que se denominó “Model fitted: Log-logistic (ED50 as parameter) with lower limit at 0 and upper limit at 1 (2 parms)” (Ritz et al, 2015).

Este programa que permitió además de determinar el porcentaje de Mortalidad, la Concentración Letal Media (CL50) y la Concentración Letal 90 (CL90), otros valores de importancia denominados “Benchmark Doses” o dosis de referencia, de los cuales destacan la Concentración a la que no se observan efectos en ningún individuo (BMDL), concentración en la que se observa un efecto en al menos un individuo (BMD); además de las Concentraciones Máximas y Mínimas (Ritz et al, 2015); todo esto referido a los resultados obtenidos a partir del bioensayo realizado, utilizando como tóxico en estudio al nitrito de sodio y como especie diana o blanco las larvas de rana *Gastrotheca sp.*

Las llamadas “Benchmark Doses” son dosis de referencia que se asemejan a los valores obtenidos en el NOAEL (BMDL) y al LOAEL (BMD), con la diferencia de que al ser un análisis netamente estadístico reportan valores mucho más precisos y extrapolables con un intervalo de confianza del 95%, a diferencia de los obtenidos de manera gráfica para las variables mencionadas anteriormente (Ritz et al, 2015).

Para el desarrollo del presente estudio se revisó artículos en donde se realizaban bioensayos toxicológicos agudos de distintos compuestos sobre determinadas especies y se observó que la mayoría de las investigaciones se reportaron a las 96 horas; sin embargo en el presente estudio se obtuvo la muerte del 100% de los individuos en 120 horas, por lo que se reportó los resultados a las 96 y 120 horas, ajustándose mejor los datos en 120 horas (Ritz et al, 2015; Marco, 2002).

4.6.3.4 Fórmulas para el Cálculo de Dosis Referenciales

Las fórmulas para las variables analizadas dependen exclusivamente de la curva dosis respuesta, ya que como es de esperar la mortalidad va a depender de la concentración del tóxico y esa información es exclusiva de la especie que se analiza (Akram, 2009).



En líneas generales se puede establecer una fórmula universal para el cálculo las variables usadas en la presente investigación debido a que todas se obtuvieron a partir de la curva dosis respuesta con el programa estadístico R versión 3.3.

La determinación de la DL50 se realiza mediante el método gráfico Probit (Línea dosis-Probit), que se la puede manejar como una ecuación de la recta estándar linealizando la curva dosis respuesta mediante el logaritmo de las dosis en el eje X; el procedimiento consiste primero en encontrar la pendiente del gráfico, con este valor y el LogDL50 hallado en la gráfica se encuentran el valor del termino independiente que puede ser extrapolado a cualquier valor de dosis que se desee conocer, incluso los valores de NOAEC y LOAEC (Akram, 2009).

A decir del autor Akram, 2009, este método es muy aproximado y parte del precepto de que se puede encontrar la ecuación de la gráfica con la pendiente esperada (con la desviación estándar del termino independiente) y el intercepto hallado en X (Log10DL50) para determinado valor de Y (Mortalidad), por lo que los programas estadísticos establecen modelos matemáticos que disminuyen el error pero mantienen este concepto.

Capítulo V

Resultados

5.1 Observaciones Organolépticas

A lo largo de las campañas de monitoreo se han registrado diversos eventos relacionados con el estado de las pozas, los cuales se resumen en la tabla 3; cabe recalcar que las observaciones que se realizan son organolépticas, es decir aquellas que se pueden realizar de manera muy superficial, sin embargo estas brindan gran información acerca del estado general de cómo marcha el proyecto de conservación de especies de anfibios.

Tabla 3. Observaciones organolépticas realizadas en las pozas diseñadas para el programa de conservación de anfibios.

Código Poza	Observaciones
TOM 1	“En esta poza se observó agua aceitosa, oscura y de bajo nivel desde un inicio del monitoreo, presentando una considerable presencia de mosquitos y libélulas en la superficie que disminuye con el paso del tiempo. Hacia el final del monitoreo se observó la presencia de algas y nenúfares, aparentemente una desaparición de anfibios que inicialmente se registraron, aunque se requiere de un monitoreo biológico para corroborarlo” (Abad et al, 2017).
TOM 2	“Inicialmente en esta poza se registró una gran cantidad de insectos y libélulas en la superficie. Hacia la cuarta semana se evidenció una gran cantidad de algas y nenúfares. Sin embargo, no se han observado eventos importantes y no se observaron renacuajos a simple vista” (Abad et al, 2017).
YAN 1	“En esta poza desde un inicio presentó problemas de bajo nivel, agua oscura y presencia de basura en la misma. Hacia la quinta semana de monitoreo se observó la presencia de un perro muerto en la misma, el cual no fue retirado sino hasta la octava semana. Durante este tiempo la poza adquirió mal olor y se volvió desagradable acercarse a ella. Tras denuncias realizadas por la ciudadanía, hacia la doceava semana se realizó una limpieza de la



	poza por parte de personal de la EMAC-EP. Esta poza se encuentra bastante aislada y se recomienda, que tras hacer una evaluación de la presencia de anfibios en el lugar, se considere el cambio de lugar de la poza” (Abad et al, 2017).
YAN 2	“La poza presentó algas y plantas de agua desde el comienzo del monitoreo, así como la presencia de renacuajos que evidentemente se desarrollaban en la misma. En general la poza presenta buenas condiciones, se ha observado una adaptación excelente de los anfibios a este hábitat” (Abad et al, 2017).
YAN 3	“Esta poza presentó algas y probables principios de eutrofización, sin embargo no se observó la presencia de anfibios en la misma, requiriéndose un monitoreo biológico. En general no se reportó inconvenientes” (Abad et al, 2017).
PAR 1	“En general esta poza mantuvo a lo largo del monitoreo, buenas condiciones sin mayores problemas por acción antropogénica. Desde el inicio se reportó la presencia de renacuajos en la misma, y se escucharon anfibios desarrollados en los alrededores. Al comenzar, los niveles de agua se encontraban bajos, pero este poco a poco comienza a subir, y se observó la acumulación de plantas en la poza. Para la quinta semana de monitoreo se evidenció un aumento en los sedimentos lo cual da un aspecto turbio al agua. Para la novena semana, el agua aclaró pero los anfibios no se ven a simple vista” (Abad et al, 2017).
PAR 2	“La poza presentó agua de coloración negra, con una presencia alta de larvas de mosquitos, sin poder determinar con certeza que exista o no la presencia de anfibios. Cabe recalcar que esta poza se encuentra constantemente a la sombra, rodeada de eucaliptos, cuyas semillas aparentemente son la causa de la coloración del agua. En esta poza se ha imposibilitado el análisis de nitritos y nitratos, tanto por su coloración así como por la presencia de hierro, que se ha reportado como una interferencia para los análisis. Se recomienda realizar una caracterización completa del agua de esta poza, y su posible traslado a lugares con mayor luz



	que permitan mejorar sus condiciones” (Abad et al, 2017).
TAR 1	“Esta poza presentó un nivel extremadamente bajo de agua desde el principio, y se observó además la presencia de algas y agua aceitosa hacia la sexta semana. Se recomienda hacer una revisión de la geo-membrana de la misma, que podría tener alguna fuga o filtración importante” (Abad et al, 2017).
TAR 2	“Esta poza presentó desde un comienzo una gran cantidad de algas, y además con el pasar del tiempo se registró la presencia de nenúfares, mostrando posiblemente inicios de eutrofización. Se observa además un oscurecimiento del agua y un nivel bajo de agua. Al término del monitoreo abarcado en el presente estudio se comienzan obras de construcción en la zona, cuyos efectos valdría la pena analizar y posiblemente mitigar tanto para la vegetación como para el estado de salud de los posibles anfibios que se encuentren en el lugar” (Abad et al, 2017).
TAR 3	“En esta poza se observaron anfibios desde la primera semana de monitoreo, estos están muy cercanos a la superficie y además el agua presentaba una gran cantidad de larvas de mosquito. A medida que pasan las semanas se evidenció una considerable disminución de las larvas de mosquito pero la cantidad de anfibios aparentemente se mantuvo. En esta poza se registró además incidentes con niños de una escuela cercana, quienes se encontraban dentro de la poza retirando los renacuajos. Con este evento, se recomienda una campaña de educación ambiental especialmente a escuelas cercanas a las pozas de la ciudad, y además que se pida la vigilancia de las mismas” (Abad et al, 2017).

La aparición de anfibios en las pozas varía considerablemente a lo largo de las campañas de monitoreo, se observó la presencia de ranas en algunas pozas, mientras que en otras se observó solamente en ciertas ocasiones como se describe en la tabla 3. Cabe recalcar que todas las observaciones reportadas no fueron realizadas por expertos en el tema, sino por técnicos de la parte química abiótica.



5.2 pH, Conductividad, Temperatura del Agua y Oxígeno Disuelto de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

De estos análisis realizados se realiza la estadística descriptiva a partir de los resultados, así como gráficas que ilustran las variaciones registradas en la duración del monitoreo. Cabe recalcar que las campañas de monitoreo 11 y 12 se realizan dentro de la misma semana para evaluar cambios significativos de las variables.

5.2.1 pH de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Los resultados para este parámetro fueron los esperados, obteniéndose un pH promedio de 7,87, ligeramente alcalino que no afectaría el normal desarrollo de especies en el ecosistema acuático. La variación entre el mínimo valor obtenido que corresponde a la poza PAR2 (7,52) y el máximo valor obtenido correspondiente a la poza TOM2 (8,20) no se considera relevante ya que múltiples factores pueden provocar ascensos y descensos en el pH sin que estos constituyan un factor que altere el hábitat; La dispersión de datos varía ligeramente, obteniendo valores de desviación estándar más pequeños en la poza YAN2 (0,12) y valores más altos en la poza TAR2 (0,37); como se puede observar en la tabla 4.

Tabla 4. pH de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

pH de las pozas						
Código	Media	Mediana	Desviación Estándar	Rango	Mínimo	Máximo
TOM1	7,64	7,61	0,22	1,00	7,11	8,11
TOM2	8,09	8,01	0,32	0,99	7,69	8,68
YAN1	7,86	7,79	0,40	1,39	7,45	8,84
YAN2	7,66	7,68	0,12	0,41	7,46	7,87
YAN3	8,02	7,96	0,21	0,78	7,86	8,64
PAR1	8,20	7,92	0,59	1,65	7,68	9,33
PAR2	7,52	7,48	0,14	0,41	7,32	7,73



TAR1	7,97	7,94	0,31	0,95	7,63	8,58
TAR2	7,94	7,84	0,37	1,41	7,63	9,04
TAR3	7,81	7,71	0,36	1,13	7,45	8,58

De estos datos, se observa un aumento general en los valores de pH en la séptima semana, pudiendo ser a causa del aumento de las precipitaciones registrado en esa fecha. Algunas pozas además evidencian un aumento en los valores de pH súbitos, como es el caso de YAN1, en donde el valor de pH sube en la cuarta y octava semana, pudiendo ser a causa de un factor externo. Las pozas en donde se registró presencia de ranas (PAR1, YAN2 y TAR3) tienen un promedio general de 7,89. En general los rangos de pH están dentro de los límites permisibles descritos en el TULSMA que son de 6,5 a 9 unidades de pH; estas variaciones quedan registradas en la figura 4, en donde se puede observar el comportamiento de esta variable en función del tiempo.

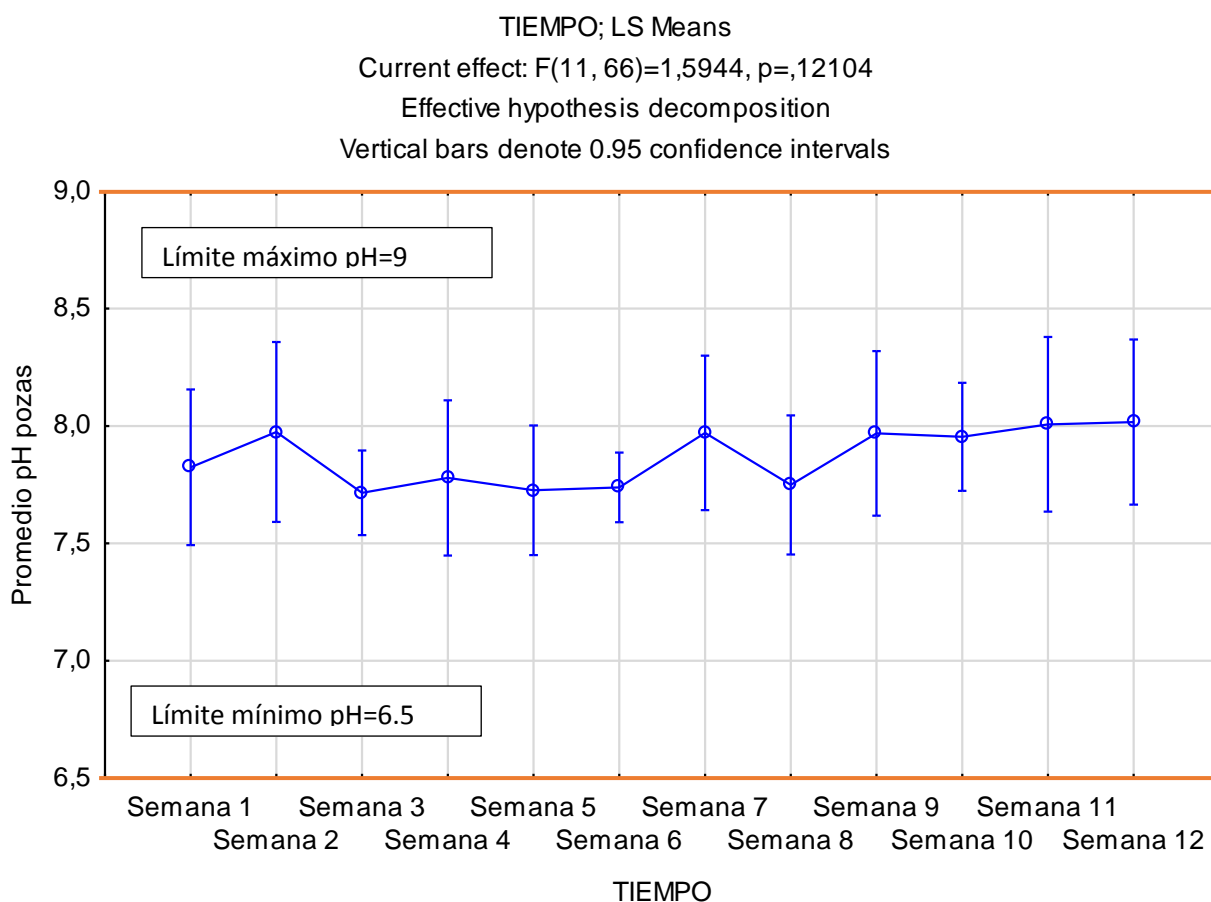


Figura 4. Comportamiento de pH del agua de las pozas con relación al tiempo de duración del estudio durante las campañas de monitoreo



Los resultados evidencian además que no hay diferencias significativas de pH a medida que transcurre el estudio (valor $f=1.59$; valor $p=0.12$); al igual que si se compara el valor del pH con los sectores en donde se encuentran ubicadas las pozas tampoco se encuentra una relación significativa ($f=0.028$; $p=0.99$), como se observa en la figura 5

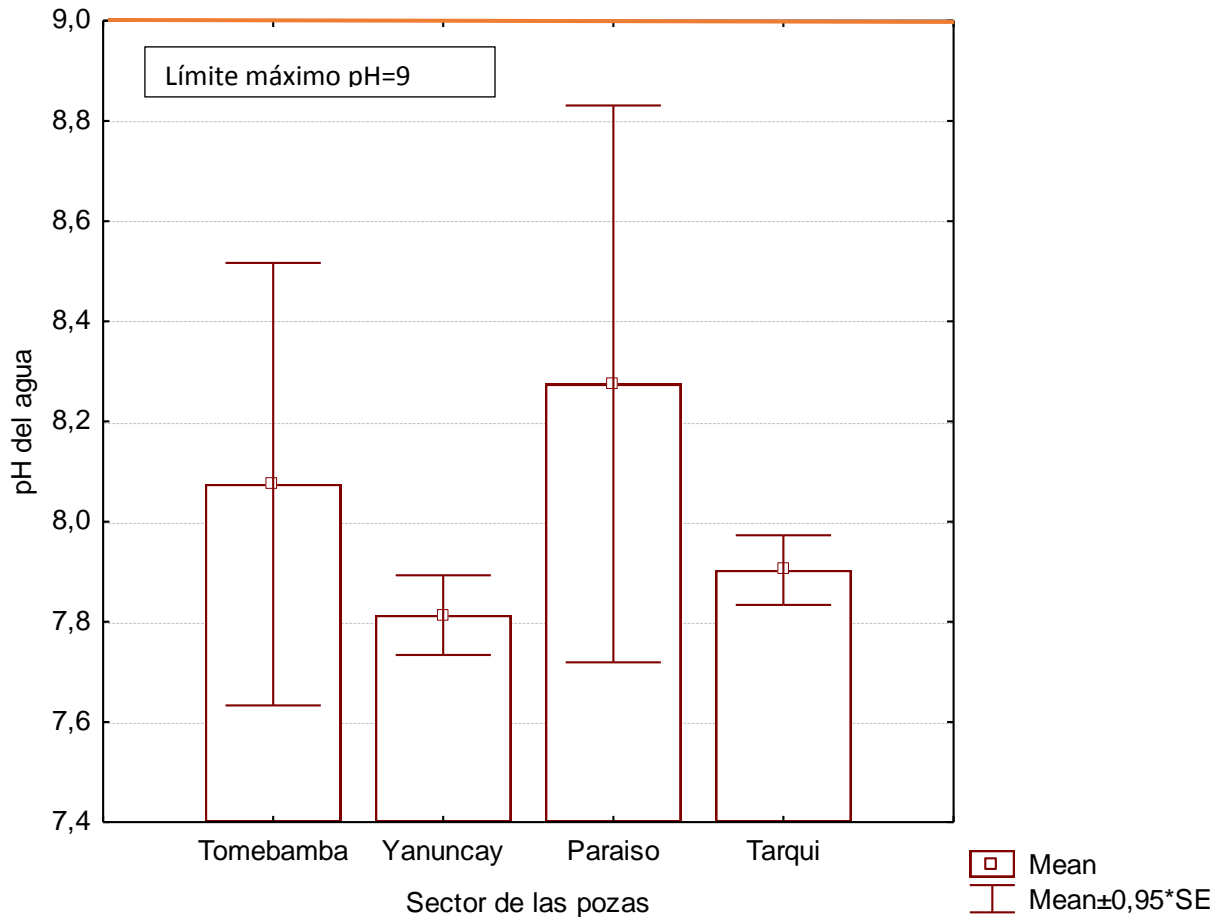


Figura 5. Comportamiento del pH del Agua de las pozas en cada sector de la ciudad.

5.2.2 Temperatura del Agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

En la presente investigación se ha presentado variaciones considerables ya que se maneja un rango entre $13,8^{\circ}\text{C}$ y $20,9^{\circ}\text{C}$; sin embargo resulta fundamental resaltar que las valoraciones se realizaron a diferente hora debido al tiempo que toman los traslados de un sitio a otro, este hecho se hace más notorio en las pozas como PAR1 y PAR2 que tienen una temperatura más elevada a comparación de las pozas TOM1 y TOM2 que mantienen promedios bajos y en donde la única variación entre las mismas fue la hora de la



medición; en cualquiera de los casos la temperatura nunca se observó fuera de los rangos tolerables por las especies que pudiesen habitar estos ecosistemas, como se describe a continuación en la tabla 5.

Tabla 5. Temperatura del Agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Temperatura del Agua de las Pozas Artificiales (°C)						
Código Poza	Media	Mediana	Desviación Estándar	Rango	Mínimo	Máximo
TOM1	16,54	16,50	1,37	5,20	14,80	20,00
TOM2	18,68	18,40	1,36	3,70	17,10	20,80
YAN1	15,69	15,60	0,97	3,60	14,60	18,20
YAN2	17,36	17,40	1,11	3,70	16,00	19,70
YAN3	17,23	17,05	1,07	3,70	16,00	19,70
PAR1	16,79	16,85	0,90	2,50	15,50	18,00
PAR2	15,13	14,90	1,38	5,40	13,80	19,20
TAR1	16,59	16,05	1,33	4,40	15,20	19,60
TAR2	17,30	17,15	1,51	5,20	15,70	20,90
TAR3	15,77	15,70	1,30	4,90	14,00	18,90

Dentro de los datos relevantes podemos diferenciar que hay pozas que se encuentran ubicadas a la sombra y otras están en contacto directo con la radiación solar, lo que lleva a una diferenciación en los promedios encontrados como es el caso de PAR 2 (15,13°C) y TOM2 (18,68°C) respectivamente. Además si se considera que las mediciones se realizaron en 12 semanas, observamos que no hay un cambio drástico en el clima, encontrando una dispersión máxima de 1,51 °C para TAR2 y una mínima de 0,90 °C para PAR1.

Se observa un aumento considerable de Temperatura en el agua a partir de la semana 7, pero disminuye a los promedios generales a partir de la semana 9; pudiendo atribuirse este hecho a un aumento general en la temperatura climática y a un aumento en las precipitaciones justamente en las fechas correspondientes a los monitoreos.

Las variaciones de temperatura en general se pueden considerar insignificantes, debido a que la mayor variación de temperatura se registra en la poza TAR1 y es apenas de un grado centígrado; este hecho no va a

constituir un factor que pueda alterar de ninguna manera el normal desarrollo de las especies que pudiesen habitar el ecosistema acuático.

La variación de temperatura a lo largo de las semanas que duró el monitoreo se puede observar en la figura 6 a continuación.

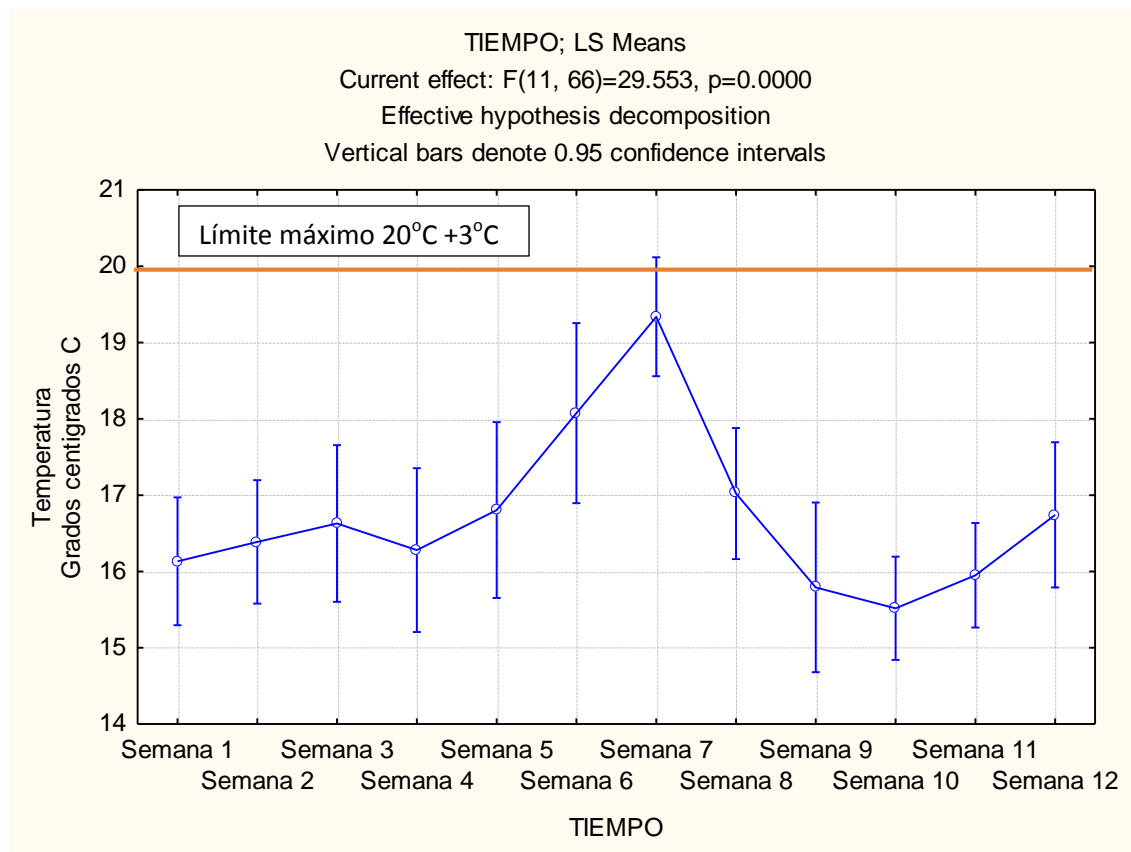


Figura 6. Comportamiento de la Temperatura del Agua de las pozas durante las campañas de monitoreo.

Los resultados muestran además que existen diferencias significativas en cuanto a lo largo del tiempo en el que se desarrolló la investigación ($f=29.55$; $p=0.000$), un hecho que se evidencia principalmente en las semanas 6 y semana 7; así mismo se puede comprobar que el sector no influye en las fluctuaciones de temperatura ($f=0.86$; $p=0.510$); como se puede observar en la figura 7.

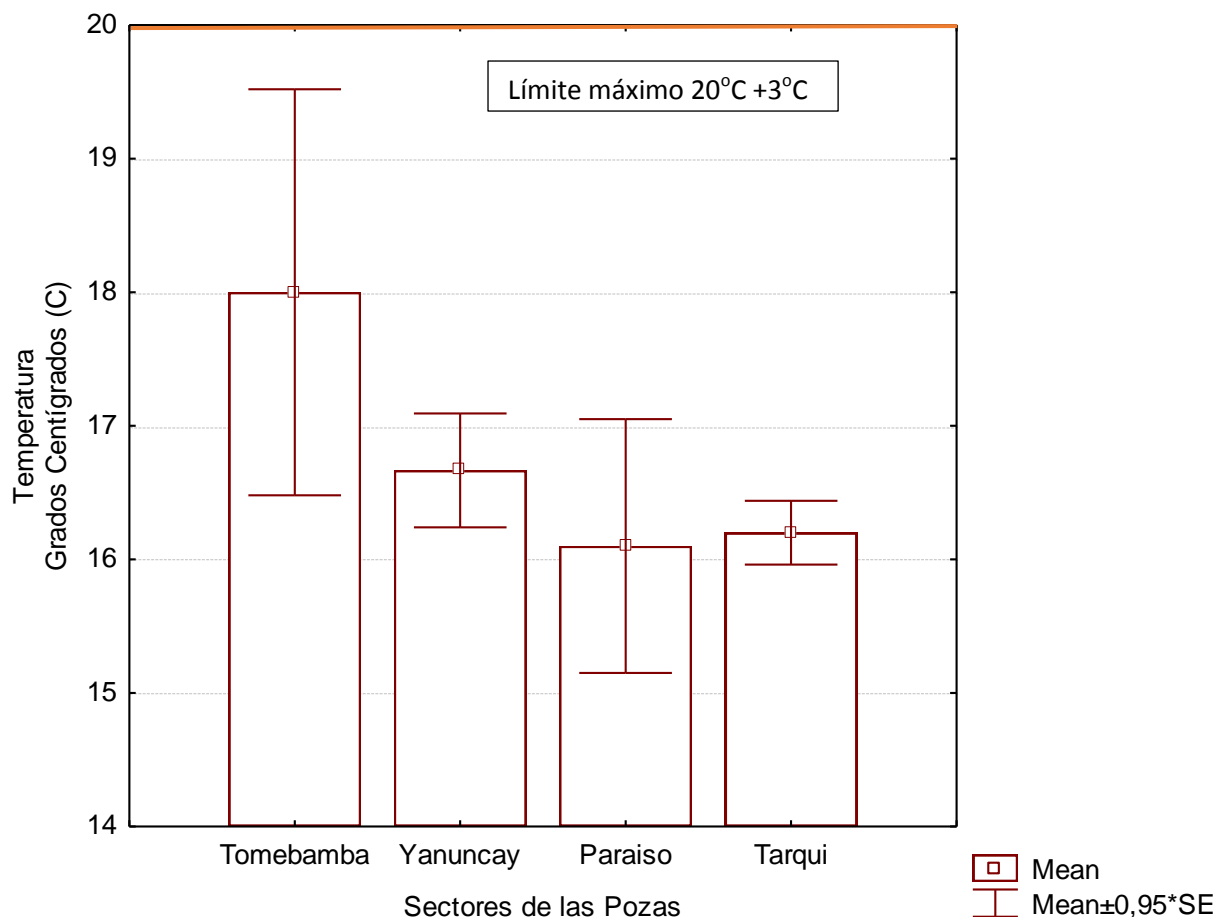


Figura 7. Comportamiento de la Temperatura del Agua de las pozas en cada sector de la ciudad.

5.2.3 Oxígeno Disuelto de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Considerando que el valor de 7,22mg/L o partes por millón correspondería al 100% de oxígeno, de acuerdo a la normativa nacional vigente; como se puede observar en la tabla 6 y tabla 7 que se expresan los resultados en unidades de concentración de oxígeno disuelto y en unidades de porcentaje respectivamente. Resulta notorio en estas mediciones la baja concentración de oxígeno disuelto de la mayoría de pozas al empezar las campañas de monitoreo que fue aumentando progresivamente a partir de la semana 6, lo que coincide con el aumento significativo de las precipitaciones que se mantienen hasta el final de los monitoreos como se puede observar en las tablas 6 y 7 a continuación.



Tabla 6. Oxígeno Disuelto de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.* medida en partes por millón.

Oxígeno Disuelto de las Pozas Artificiales (mg/L)						
Código Poza	Media	Mediana	Desviación Estándar	Rango	Mínimo	Máximo
TOM1	2,16	2,12	1,20	4,55	0,26	4,81
TOM2	5,03	4,90	1,64	5,30	2,39	7,69
YAN1	1,60	1,46	0,53	1,58	0,88	2,46
YAN2	3,51	3,17	0,89	2,77	2,28	5,05
YAN3	4,92	4,67	1,16	3,91	3,65	7,56
PAR1	4,47	4,39	1,38	4,41	2,63	7,04
PAR2	0,96	0,90	0,23	0,78	0,72	1,50
TAR1	4,29	4,28	1,79	5,45	1,05	6,50
TAR2	3,20	3,20	1,58	6,36	0,34	6,70
TAR3	1,03	0,82	0,79	2,93	0,18	3,11

Tabla 7. Oxígeno Disuelto de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.* medida en porcentaje.

Oxígeno Disuelto de las Pozas Artificiales (%)						
Código Poza	Media	Mediana	Desviación Estándar	Rango	Mínimo	Máximo
TOM1	30,04	28,80	16,96	63,50	3,40	66,90
TOM2	71,92	71,65	26,51	90,00	18,00	108,00
YAN1	21,53	19,50	7,25	21,10	12,10	33,20
YAN2	49,22	44,45	13,03	42,20	32,30	74,50
YAN3	68,57	65,95	16,57	55,50	50,30	105,80
PAR1	61,67	59,81	18,08	57,90	36,30	94,20
PAR2	12,67	11,80	3,06	10,80	9,40	20,20
TAR1	59,41	59,38	25,18	77,80	14,00	91,80
TAR2	45,03	44,00	23,31	95,00	4,60	99,60
TAR3	14,11	10,80	11,26	41,70	2,50	44,20

Se observa que en los valores máximos de porcentaje muchos superan el 100%, esto es debido a que se considera el valor de 7,22mg/L como el valor en



donde teóricamente se tiene la mayor cantidad de oxígeno y se calibra el equipo de medición con este dato, lo que no quiere decir que de forma práctica no se puedan obtener valores superiores en el agua.

A pesar de la marcada variación que se observa entre las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua de las pozas, en general se pudo constatar que las de mejor oxigenación fueron TOM2 (5,03 mg/L – 71,92%), YAN3 (4,92 mg/L – 68,57%) y PAR1 (4,47 mg/L – 61,67%) con notorias variaciones entre las distintas campañas de monitores; en promedio las pozas no cumplieron con la normativa descrita en el Libro VI Anexo I del TULSMA que establece que el agua dulce fría para fines de conservación de especies debe contener no menos del 80% ó 6 mg/L de concentración de oxígeno disuelto; todas estas variaciones a lo largo del tiempo que se dieron se registran a continuación en la figura 8.

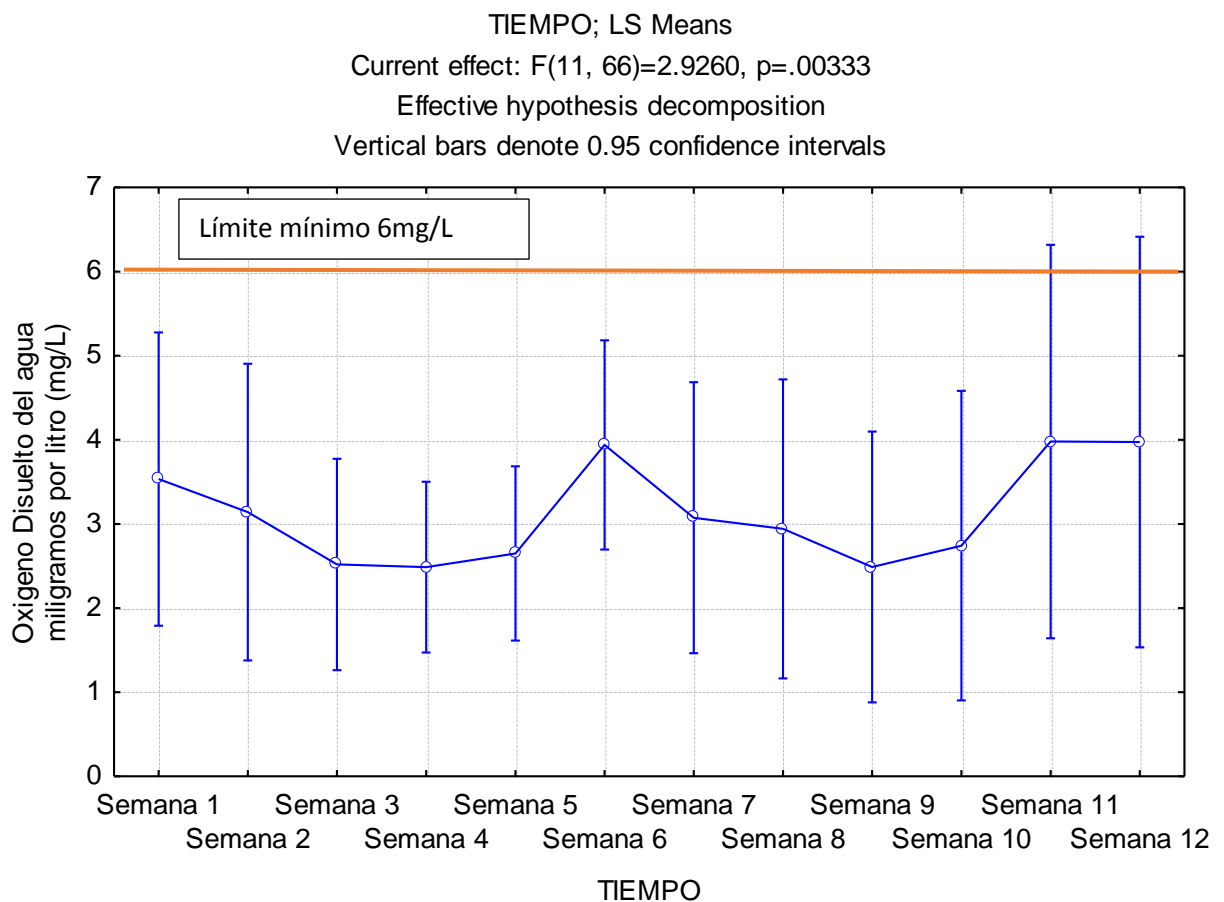


Figura 8. Comportamiento del Oxígeno Disuelto en el agua de las pozas durante las campañas de monitoreo.



Las pozas en las que se encontró el mayor problema por la baja concentración de oxígeno disuelto fueron YAN1 (1,6mg/L - 21,53%), PAR2 (0,93mg/L - 12,57%) y TAR3 (1,03mg/L - 14,11%), sin tener factores externos visibles que puedan ser los responsables de los bajos niveles de oxígeno, pero con ciertas características que se enumeran a continuación, en la poza YAN se encontró la presencia de materia orgánica en descomposición (perro muerto) con un olor desagradable a partir de la sexta semana de monitoreo; en el caso de la poza PAR2 igualmente se obtienen valores bajos en la concentración de oxígeno disuelto, situación que no varía mucho a lo largo de las campañas de monitoreo, en esta poza lo más destacable es la coloración oscura del agua que en cierta medida podría ser responsable del déficit de oxígeno, pero que se debería comprobar con un análisis más profundo de los componentes de esta poza; finalmente la poza TAR3 presentó niveles bajos de oxígeno durante todo el monitoreo, situación que no cambió en el final luego que se presentaron precipitaciones como si pasó en la mayoría de pozas, en este hábitat es notable así mismo la proliferación de algas en la superficie del agua, así como la presencia de ranas desde que se iniciaron los monitoreos, este hecho concuerda con lo que describe (Siavichay et al, 2016) que manifiestan que la adaptación de los anfibios a las condiciones del medio es notable, en este caso a la falta de oxígeno.

Los resultados evidencian además cambios significativos en los valores de oxígeno disuelto a medida que se avanza con las campañas de monitoreo ($f=2.926$; $p=0.03$), en donde los mayores cambios se los puede describir en las semanas 6, 11 y 12, pudiendo ser un factor para este cambio el inicio del período de precipitaciones; por otra parte no existe una diferencia significativa de los valores de oxígeno disuelto de acuerdo con el sector en donde se encuentran ubicadas las pozas ($f=0.110$; $p=0.951$), como se puede observar en la figura 9.

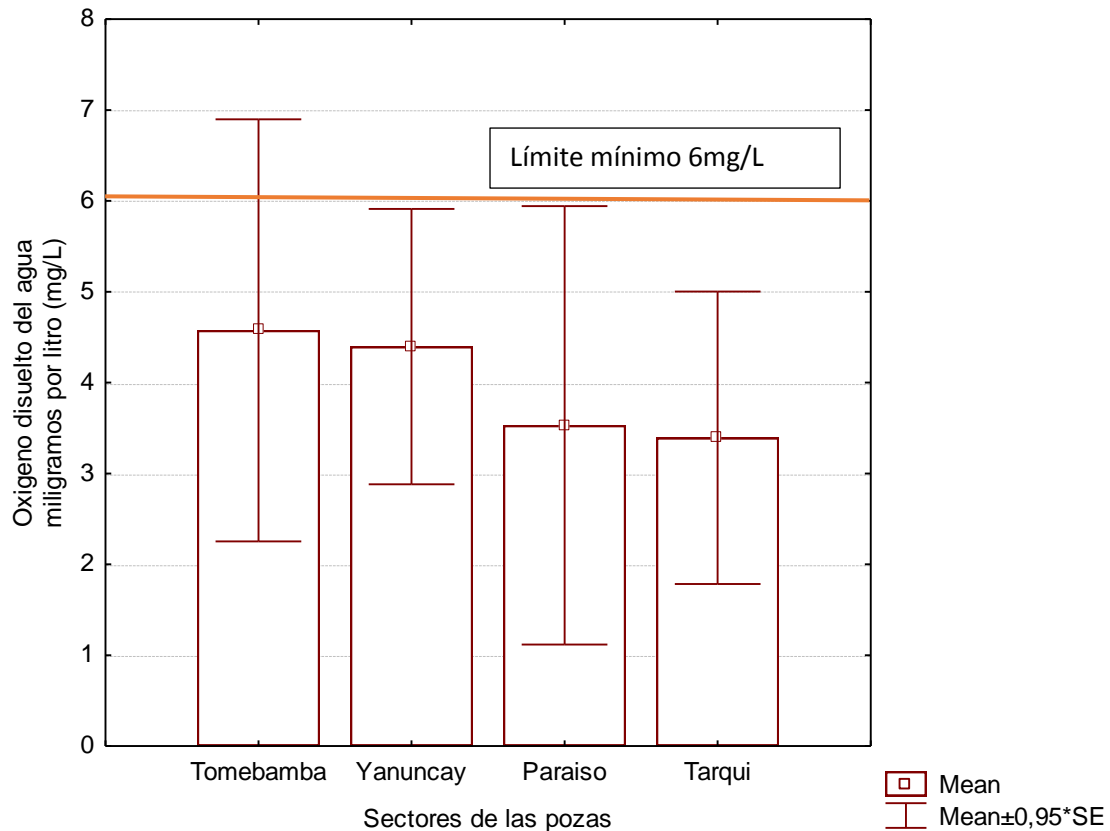


Figura 9. Comportamiento del Oxígeno Disuelto del agua de las pozas en cada sector de la ciudad.

5.2.4 Conductividad de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Los valores de conductividad en las pozas varían entre 186,9 y 378 $\mu\text{s}/\text{cm}$, el promedio en general es de 266,16 $\mu\text{s}/\text{cm}$; la mayor concentración se observa en la poza TOM1 (338,58 $\mu\text{s}/\text{cm}$) y la menor concentración se presenta en la poza YAN3 (224,34 $\mu\text{s}/\text{cm}$); lo que llama la atención de estos resultados es la dispersión de los datos en cada poza, así en PAR1 encontramos una desviación estándar de 34,95 $\mu\text{s}/\text{cm}$ y en YAN3 el valor aumenta a 40,66 $\mu\text{s}/\text{cm}$; esto puede deberse a múltiples factores entre los que se pueden destacar la presencia de organismos vivos que al desarrollarse en estos hábitats aumentan la producción de sales y consecuentemente la conductividad; así mismo este hecho no indica a ciencia cierta que se haya producido la llegada o el aumento de ranas en las pozas, ya que la conductividad puede aumentar también por el metabolismo de otras especies animales o incluso de algas o plantas que se



encuentren cercanas a las pozas e incluso debido a actividades antropogénicas que se den en la periferia de estos hábitats, a continuación en la tabla 8 se puede observar un resumen de los valores preponderantes de conductividad obtenidos en el presente estudio.

Tabla 8. Conductividad de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.* ($\mu\text{s/cm}$).

Conductividad de las Pozas Artificiales ($\mu\text{s/cm}$)						
Código Pozas	Media	Mediana	Desviación Estándar	Rango	Mínimo	Máximo
TOM1	338,58	344,00	25,81	83,00	287,00	370,00
TOM2	269,00	265,00	22,30	68,00	241,00	309,00
YAN1	235,18	239,00	16,95	61,00	195,00	256,00
YAN2	235,16	237,50	23,08	77,10	186,90	264,00
YAN3	224,34	224,50	9,55	29,50	207,50	237,00
PAR1	248,79	242,00	34,95	93,50	207,50	301,00
PAR2	228,73	228,00	15,50	47,40	203,60	251,00
TAR1	287,25	284,50	26,14	99,00	235,00	3344,00
TAR2	286,83	280,50	19,12	59,00	260,00	319,00
TAR3	307,77	311,50	40,66	163,80	214,20	378,00

El promedio general para las pozas $263,92 \mu\text{s/cm}$ no es significativamente distinto a los valores encontrados en las pozas con presencia de ranas (PAR1, YAN2 y TAR3), se observa además un ligero aumento en la conductividad de todas las pozas a medida que se van realizando las campañas de monitoreo, esto coincide con el aumento de algas en la superficie del agua de la mayoría de las pozas; este aumento es de esperarse debido a que se trata de agua estancada que es un potencial hábitat para muchas especies acuáticas tanto animales como vegetales.

El aumento de las precipitaciones que se dio a partir de la séptima semana de monitoreo es un factor fundamental a tomar en cuenta por el que puede haber aumentado la conductividad, debido a que la lluvia arrastra tierra y demás elementos provenientes de otros lugares hacia las pozas, lo que pudiera llevar a un aumento en la conductividad sin que haya un aumento de la actividad en



los ecosistemas acuáticos por parte de las especies que habitan en los mismos.

Los valores de conductividad dentro de los límites obtenidos en el presente estudio no representan una amenaza para las especies que habitan en las pozas e indican simplemente que se están desarrollando funciones metabólicas normales de flora y fauna, un incremento superior podría indicar la presencia de tóxicos en el agua (Massol, 2000), pero hasta la última campaña de monitoreo no se dio este caso, como se puede observar en la figura 7 en donde se detalla la variación de la conductividad en cada semana de monitoreo.

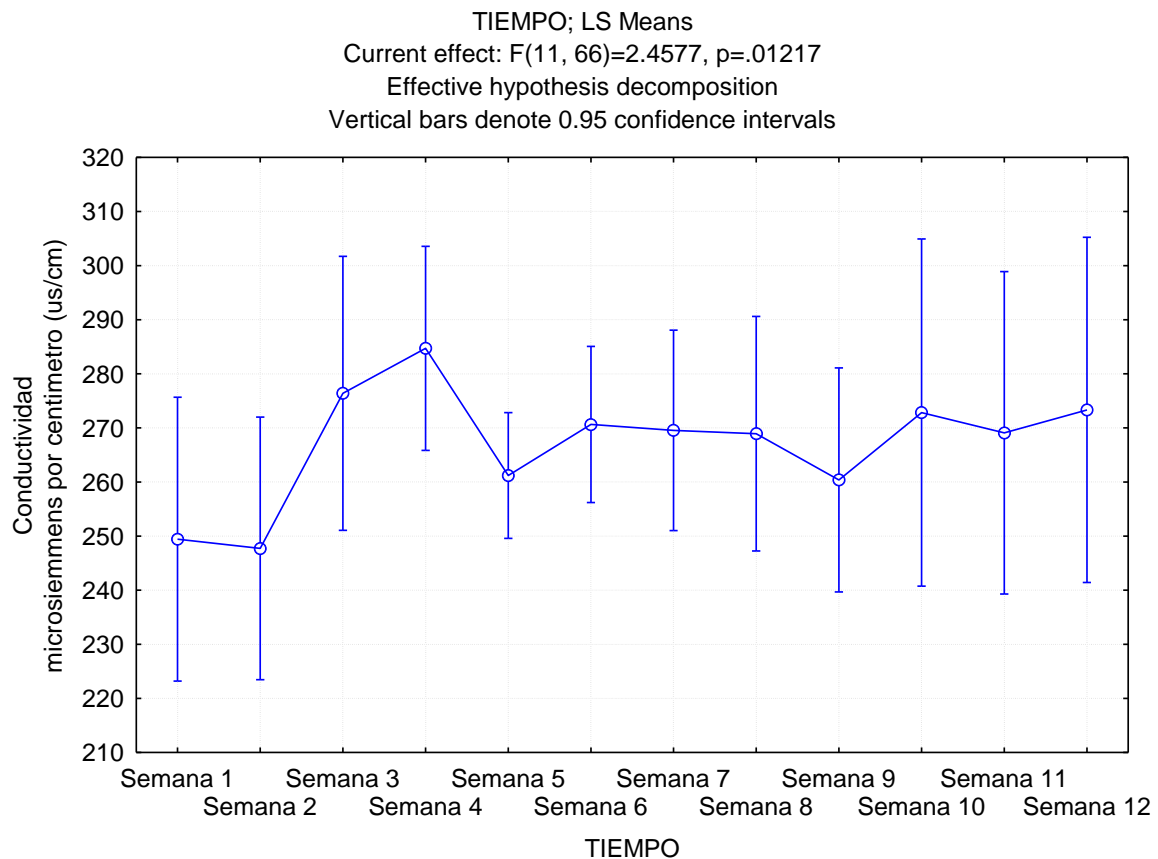


Figura 10. Comportamiento de la Conductividad del agua de las pozas durante las campañas de monitoreo.

Los resultados evidencian además diferencias significativas en los valores de conductividad a medida que transcurre el presente estudio ($f=6.85; p=0.023$), con un aumento constante cada semana; por otra parte se observa también diferencias significativas en los valores de conductividad entre los distintos sectores en donde están ubicadas las pozas ($f=2.45; p=0.012$), como se puede observar en la figura 11.

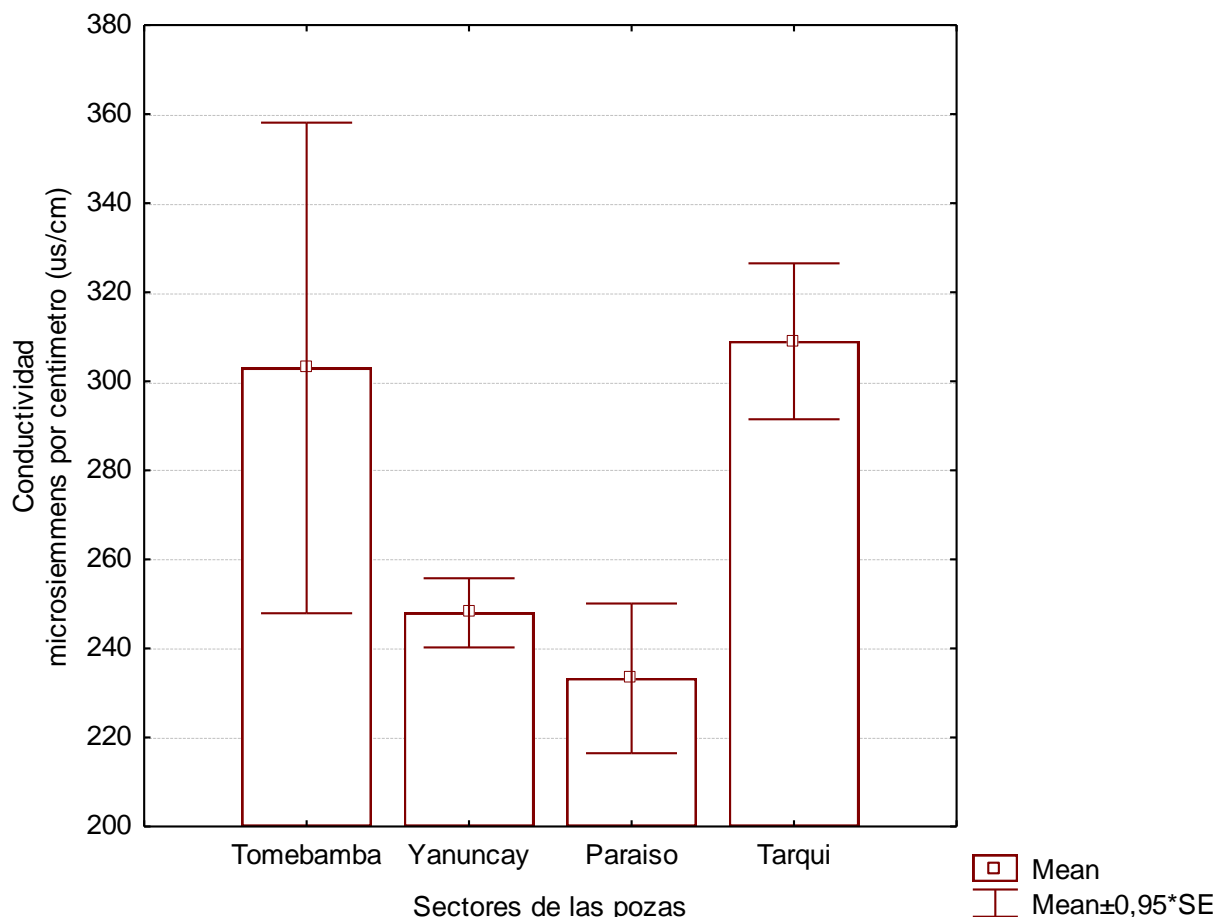


Figura 11. Comportamiento del Conductividad del agua de las pozas en cada sector de la ciudad.

5.3 Nitritos y Nitratos de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Se realizó el análisis para determinar la concentración de Nitritos y Nitratos en el agua de las diez pozas implementadas por el GAD municipal de Cuenca, sin embargo en la poza PAR2 resultó imposible la cuantificación de los derivados nitrogenados, debido a que como se menciona anteriormente el agua en esta poza tiene un color oscuro que impide la utilización del cualquier método colorimétrico o que aplique un principio similar para la determinación de un determinado elemento; en el caso de la poza TAR 3 a medida que se realizaban los monitoreos, se observó la presencia de un color oscuro en el agua que en cierta medida impidió el análisis, sin embargo los resultados se colocan en la estadística para nitritos y nitratos como se puede observar en la tablas 9 y 10 respectivamente; así como el comportamiento en las distintas semanas que duró la investigación (figura 12 y 14 respectivamente).



Tabla 9. Valores de Nitritos de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.* (mg/L)

Valores de Nitritos de las pozas artificiales							
Código Pozas	Media	Mediana	Desviación Estándar	Rango	Mínimo	Máximo	Número Análisis
TOM1	0,0134	0,003	0,0344	0,105	0,000	0,105	9
TOM2	0,0044	0,004	0,0032	0,012	0,000	0,012	10
YAN1	0,0043	0,004	0,0039	0,013	0,000	0,013	9
YAN2	0,0034	0,003	0,0015	0,005	0,001	0,006	11
YAN3	0,0037	0,003	0,0024	0,008	0,001	0,009	10
PAR1	0,0031	0,002	0,0030	0,009	0,000	0,009	11
TAR1	0,0035	0,002	0,0046	0,016	0,000	0,016	11
TAR2	0,0047	0,003	0,0044	0,014	0,001	0,015	11
TAR3	0,0055	0,006	0,0042	0,010	0,000	0,010	4

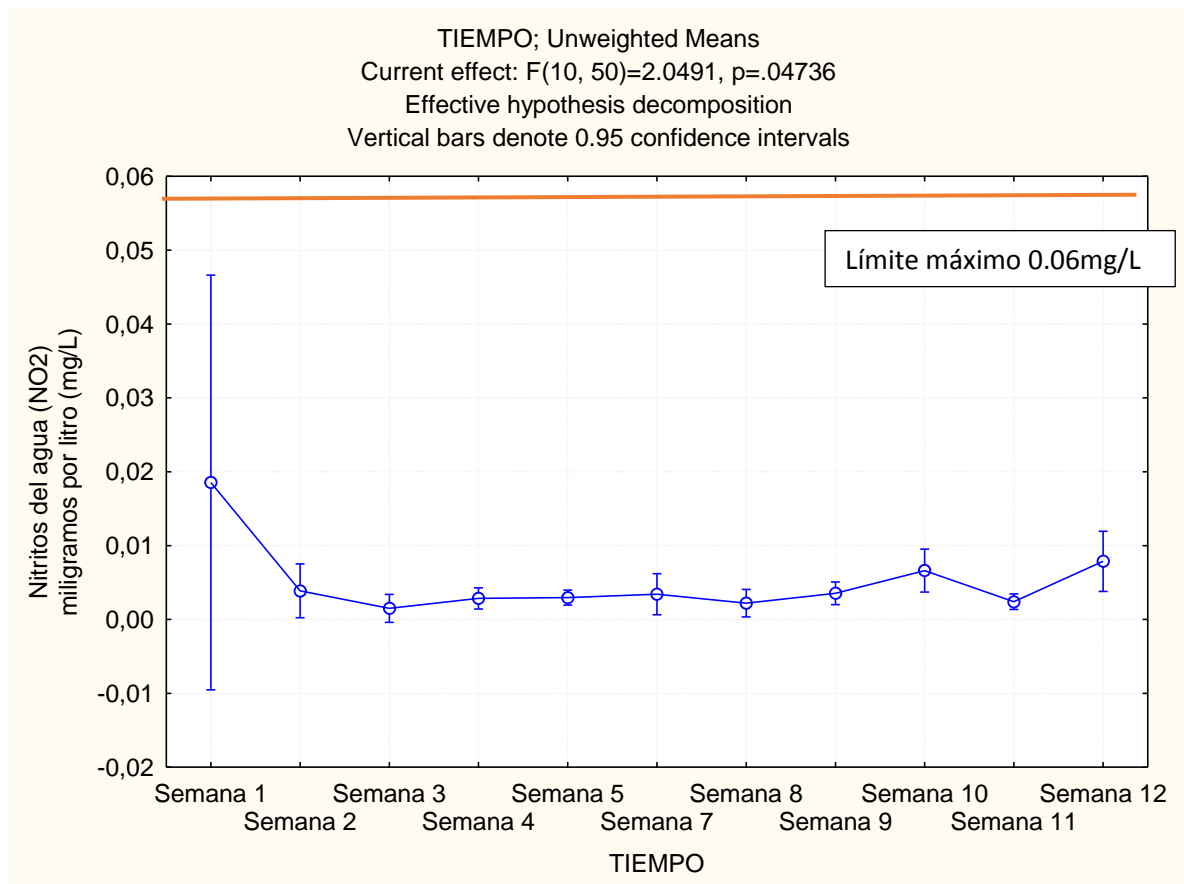


Figura 12. Comportamiento de los nitritos presentes en el agua de las pozas durante las campañas de monitoreo.

Los resultados evidencian además diferencias significativas en la concentración de nitritos en el agua de las pozas a medida que se realiza el presente estudio ($f=2.049$; $p=0.047$), pudiendo decir en líneas generales que aumenta la concentración aunque de manera muy leve; por otra parte no se han observado diferencias significativas en la concentración de nitritos con respecto a los sectores en donde se encuentran ubicadas las pozas ($f=1.54$; $p=0.312$), como se puede observar en la figura 13.

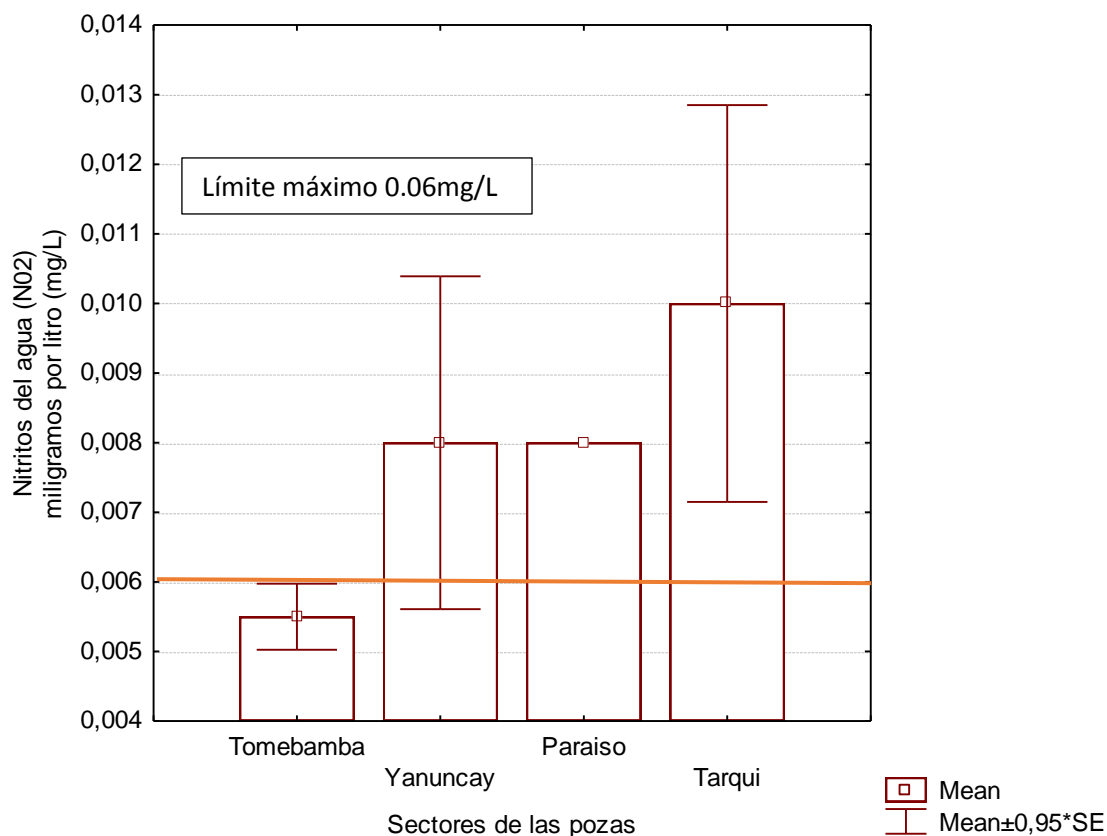


Figura 13. Comportamiento de los Nitritos del agua de las pozas en cada sector de la ciudad.

Tabla 10. Valores de Nitratos de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.* (mg/L)

Valores de Nitratos de las pozas artificiales							
Código Pozas	Media	Mediana	Desviación Estándar	Rango	Mínimo	Máximo	Número Análisis
TOM1	0,670	0,7	0,445	1,5	0,0	1,5	10
TOM2	0,855	0,6	0,505	1,5	0,4	1,9	11
YAN1	0,790	0,8	0,465	1,6	0,3	1,9	10
YAN2	0,836	0,7	0,375	1,4	0,4	1,8	11



YAN3	0,827	0,8	0,269	0,9	0,5	1,4	11
PAR1	0,591	0,6	0,311	1,0	0,0	1,0	11
TAR1	0,636	0,5	0,406	1,5	0,2	1,7	11
TAR2	0,636	0,6	0,326	1,2	0,2	1,4	11
TAR3	0,286	0,1	0,426	1,2	0,0	1,2	7

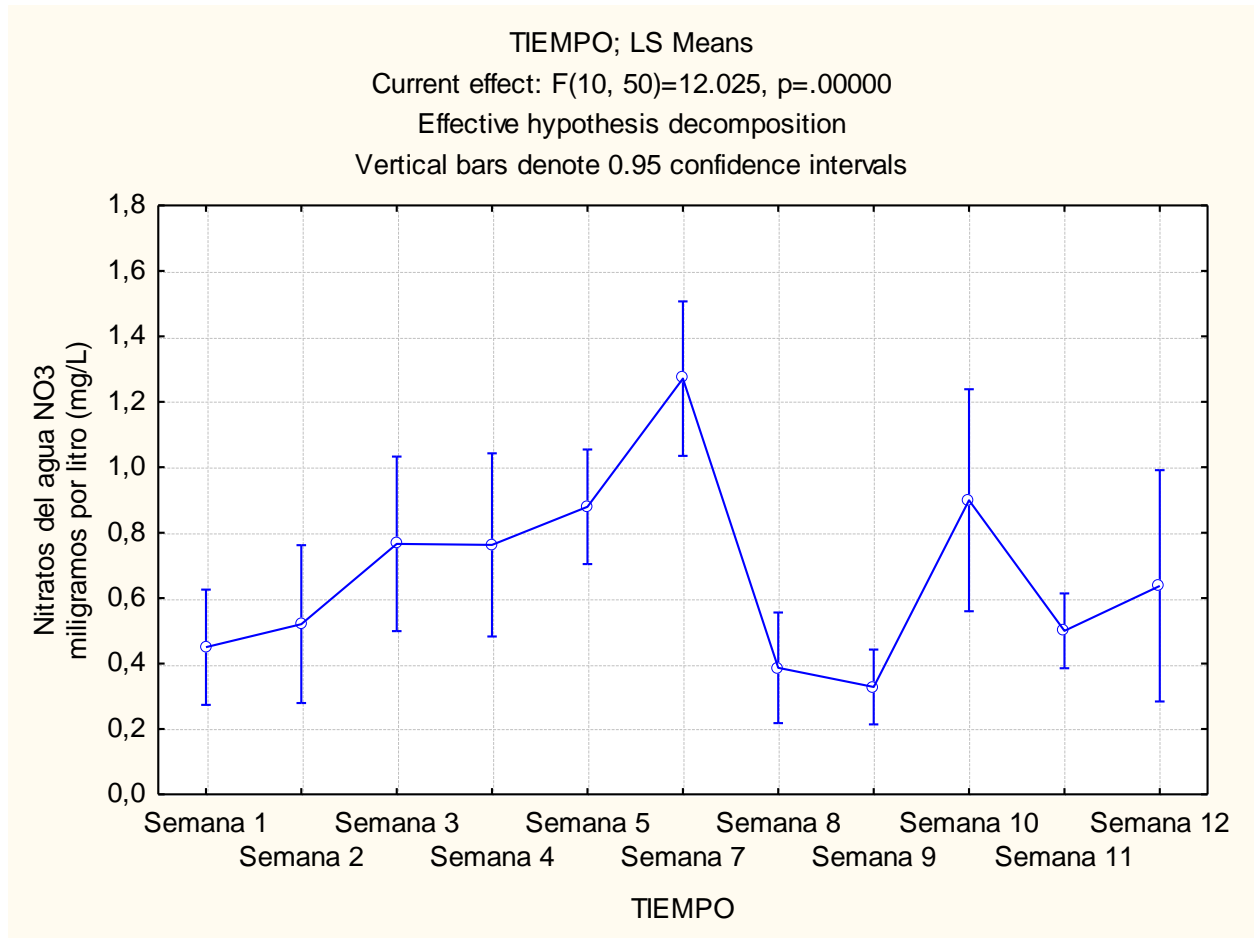


Figura 14. Comportamiento de los Nitratos en el agua de las pozas durante las campañas de monitoreo.

Se observó en general valores que se fueron incrementando desde el inicio del monitoreo; sin embargo, no se puede asegurar que estos sean elevados o no pues no se conocen los límites de tolerancia para los anfibios en general o para las especies de rana protegidas en particular, por lo cual se decidió realizar un bioensayo toxicológico con nitrito de sodio sobre la especie de rana que se busca conservar que es la rana marsupial azuaya o *Gastrotheca sp.*



Para los nitritos el promedio general el agua de las pozas es de 0,0051mg/L, con una variación que va desde 0mg/L hasta 0,105mg/L dependiendo de cada poza, la concentración fue mayor en la poza TOM1 donde se vio valores superiores a 0,0134

Los rangos que se manejan para la variable nitritos comprenden valores de hasta 0,105mg/L con un promedio general de 0,0051mg/L; en la poza donde se encontró una mayor concentración de nitritos fue TOM1 con 0,0134mg/L, mientras que la que menor concentración tuvo fue PAR1 con 0,0031mg/L.

Para el caso de nitratos el rango es mucho mayor y llega hasta el valor de 1,9mg/L, se encontró un promedio de 0,681mg/L; la poza con la menor concentración correspondió a TAR3 con 0,286mg/L y la de mayor concentración de nitratos fue TOM2 con 0,855 mg/L.

Los resultados evidencian además que existen diferencias significativas en la concentración de nitratos en el agua de las pozas a medida que transcurre la investigación ($f=12.02$; $p=0.000$), con un claro aumento en la concentración en la semana 6 y una disminución marcada en la semana 9; por otro lado no se ve una diferencia significativa entre el sector en donde están ubicadas las pozas con respecto a la concentración de nitritos en el agua ($f=2.60$; $p=0.165$), como se puede observar en la figura 15, en donde cabe recalcar que para el sector del paraíso los únicos valores tomados en cuenta fueron de la poza PAR1 ya que la poza PAR2 presentó una coloración muy fuerte por lo que no se pudo realizar la determinación de los derivados del nitrógeno por el método propuesto para el presente estudio que fue un método netamente colorimétrico; el análisis de la poza PAR2 se lo hace por separado en el inciso 5.3.1.

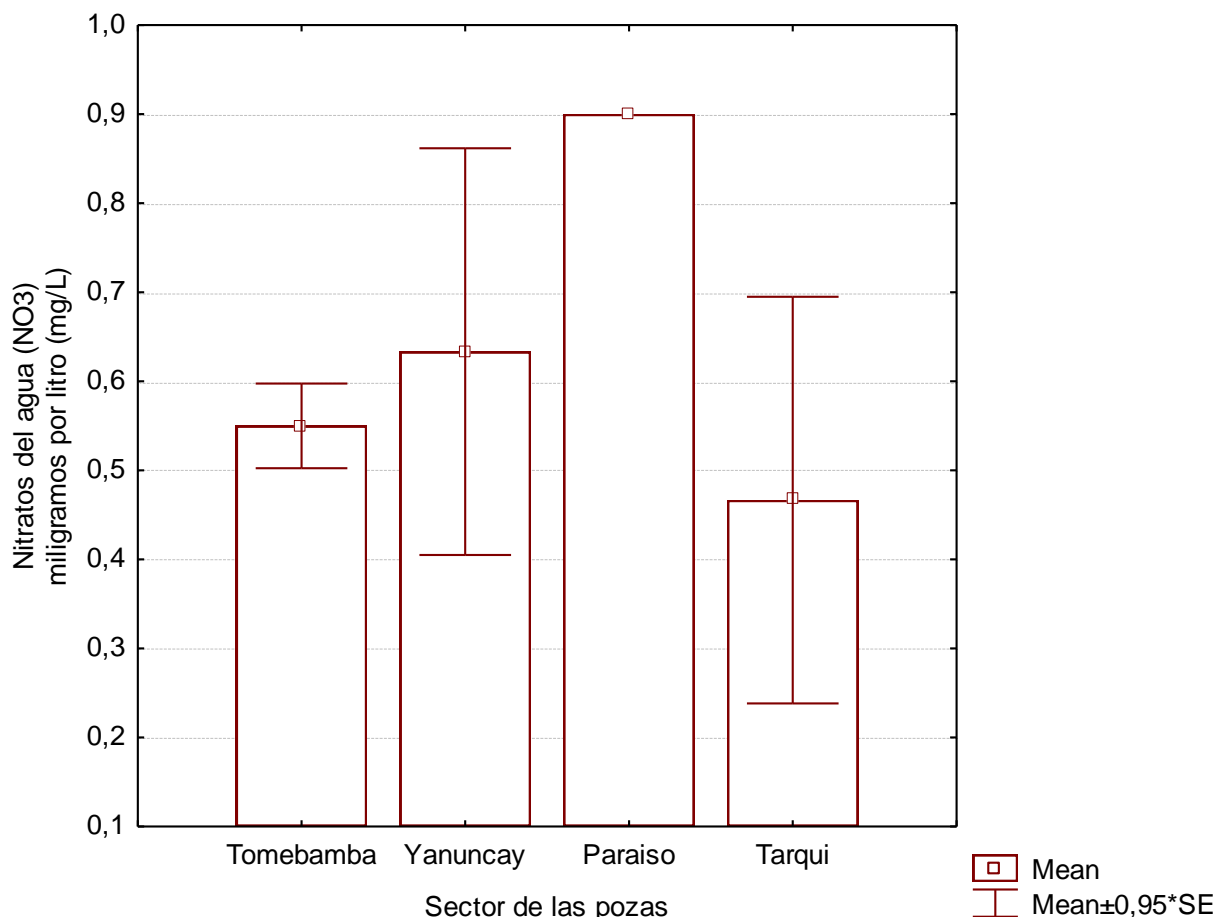


Figura 15. Comportamiento de los Nitratos del agua de las pozas en cada sector de la ciudad.

5.3.1 Análisis de la poza PAR2

Como se menciona anteriormente resulta imposible determinar valores de la concentración de nitritos y nitratos por el método espectrofotométrico utilizado en la poza PAR2, debido a la coloración oscura que tenía el agua, además de una consistencia ligeramente oleosa; en virtud de esto se realizaron análisis adicionales para encontrar interferencias o elementos de interés en este hábitat; los mismos se exponen a continuación en la tabla 11.

Tabla 11. Caracterización de la muestra PAR2.

Color Aparente	Olor	Turbiedad	Hierro Total
225 Unidades de Color Pt-Co	Eucaliptol	5 NTU	0,9mg/L

De los resultados obtenidos, llama la atención la concentración de hierro en la poza PAR2, ya que en la normativa ecuatoriana (TULSMA Libro VI Anexo 1), la concentración límite de hierro en agua para la preservación de flora y fauna es de 0,3mg/L y el resultado obtenido sobrepasa por mucho este valor permitido, además el manual de funcionamiento donde se describe las interferencias para el método colorimétrico HACH, menciona al hierro como una de las principales interferencias al momento de realizar el análisis.

5.4 Resultado Bioensayo toxicológico del Nitrito de Sodio en larvas de la especie *Gastrotheca sp.*

El bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de la especie *Gastrotheca sp.* en medios acuáticos dejó muchos resultados por analizar de los cuales se caracterizan los siguientes:

5.4.1 Estado inicial de las larvas de *Gastrotheca sp.*

Para el desarrollo del bioensayo toxicológico se buscó que el grupo de individuos que participaron en el estudio sea lo más homogéneo posible, por lo que se hicieron estudios descritos en la tabla 12 a cada uno de los miembros estudiados previo al desarrollo de la investigación.

Se considera que la presencia o no del aparato bucal es un factor muy importante que va a permitir evidenciar el estado de salud de las larvas de una especie de anuro, además de indicar la capacidad de este individuo de realizar metamorfosis, como se describe en la figura 16.

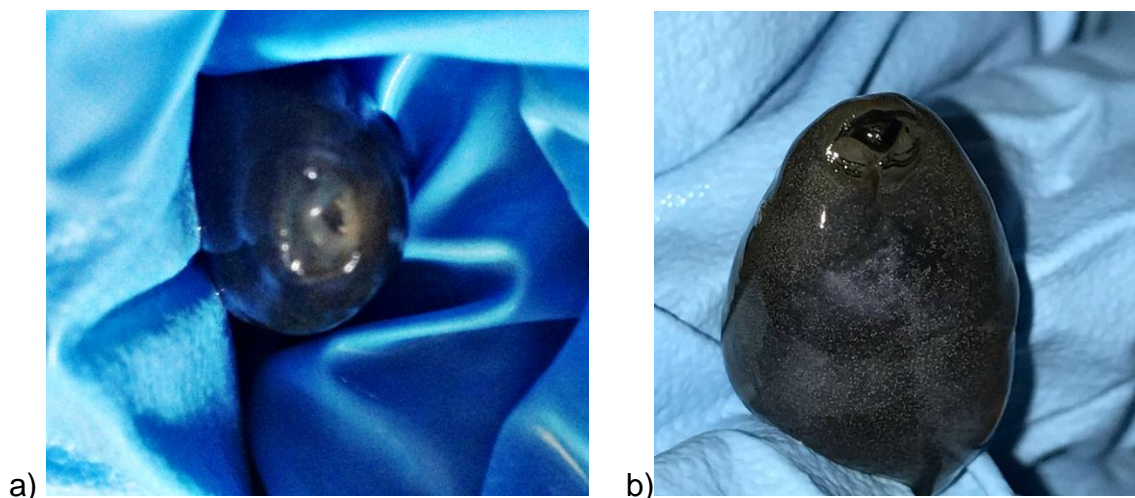


Figura 16. a) Ausencia total de hilera de dientes. b) Presencia del aparato bucal zona negra a la entrada de la cavidad oral.



Este análisis fue realizado en el centro de conservación de anfibios en el zoológico bioparque Amaru, obteniéndose las características descritas a continuación en la tabla 12.

Tabla 12. Estado general de las larvas de *Gastrotheca sp.* que participan en el bioensayo toxicológico con nitrito de sodio Notas. **APAB: Ausencia parcial de aparato bucal (hileras de dientes). ATAB: Ausencia total del aparato bucal. AS: Aparentemente sanos.**

Número de Terrario	Observaciones
1 (0,3ppm)	2 individuos con APAB
2 (0,6ppm)	Todos AS
3 (1,2ppm)	1 individuos con ATAB
4 (2,4ppm)	2 con APAB
5 (4,8ppm)	Individuos AS
6 (6,1ppm)	1 con APAB, 1 con ATAB
7 (10ppm)	1 con APAB, 1 con ATAB
8 (20ppm)	1 con APAB
9 (40ppm)	2 individuos con APAB
10 (80ppm)	Individuos AS
11 (160ppm)	Individuos AS
12 (control)	1 con ATAB

5.4.2 Necropsia de las larvas de *Gastrotheca sp.*

Las necropsias fueron realizadas en el zoológico bioparque Amaru a partir de los primeros renacuajos que murieron en el desarrollo del bioensayo toxicológico.

Los médicos reportaron la muerte de especímenes en el terrario 9, 10 y 11 con las siguientes características:

El cadáver del renacuajo del terrario 9 por su estado avanzado de putrefacción y tamaño corporal muy pequeño, se decidió no se realizar la necropsia.

En los terrarios 10 y 11 se realizaron dos necropsias respectivamente; se observó que estos renacuajos presentan hileras de dientes completas y no se evidencian lesiones macroscópicas aparentes a nivel de piel. Se encontraron

zonas hemorrágicas en hígado e intestino. El hígado del renacuajo del terrario 10 presentó un color rosa pálido, mientras que el otro tenía un hígado color rojo oscuro (normal).

Estas lesiones podrían atribuirse claramente a un factor toxicológico, debido a que estos individuos obtienen sus nutrientes, hidratación y respiración a través de la vía oral, mediante las branquias y piel, por lo que en una intoxicación se verían afectados órganos internos importantes como el hígado y el sistema digestivo, provocando alteraciones a nivel sanguíneo cuando se encuentran en medios o ecosistemas contaminados, como se observa en la figura 17.

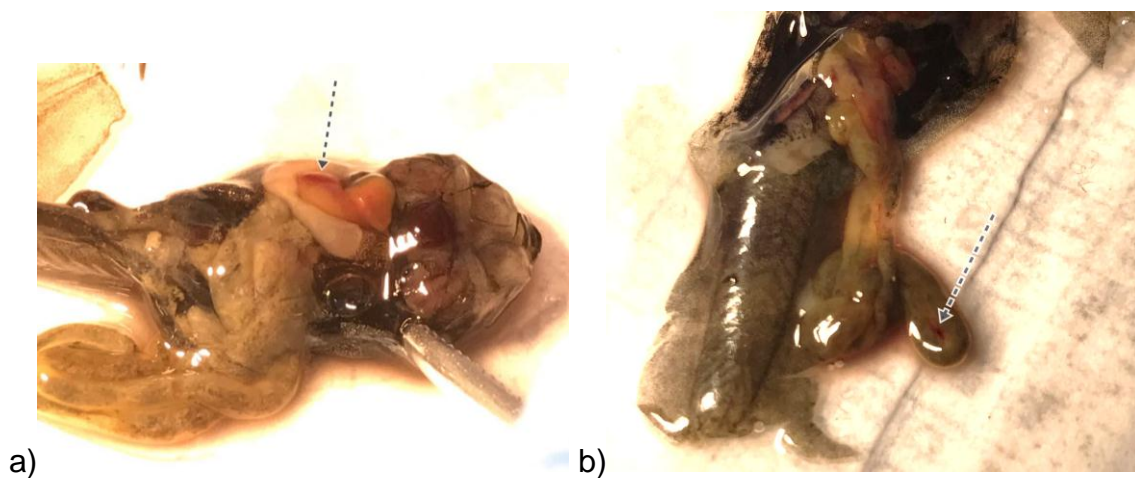


Figura 17. a) Hígado pálido con zonas hemorrágicas. b) Hemorragia entre asas intestinales.

5.4.3 Bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de *Gastrotheca sp.*

En la tabla 13, se puede observar los resultados de la mortalidad de las larvas de la especie *Gastrotheca sp.* cuando se las expone a concentraciones ascendentes de nitrito de sodio; el ensayo se realizó por duplicado y los resultados se observan en la tabla 14.



Tabla 13. Supervivencia de las larvas de *Gastrotheca sp.* que se someten a concentraciones ascendentes de nitrito de sodio.

Supervivencia de las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i>						
Concentración de Nitrito de Sodio	Día 0 0 horas	Día 1 24 horas	Día 2 48 horas	Día 3 72 horas	Día 4 96 horas	Día 5 120 horas
0 ppm	10	10	10	10	10	10
0,3 ppm	10	10	10	10	10	10
0,6 ppm	10	10	10	10	10	10
1,2 ppm	10	10	10	10	10	10
2,4 ppm	10	10	10	10	10	10
4,8 ppm	10	10	10	10	10	10
6,1 ppm	10	10	10	10	10	10
10 ppm	10	10	10	10	10	10
20 ppm	10	10	10	10	9	8
40 ppm	10	10	7	7	7	6
80 ppm	10	8	7	5	3	1
160 ppm	10	8	7	4	2	0

Tabla 14. Duplicado de la supervivencia de las larvas de *Gastrotheca sp.* que se someten a concentraciones ascendentes de nitrito de sodio.

Duplicado de la Supervivencia de las larvas de <i>Gastrotheca sp.</i>						
Concentración de Nitrito de Sodio	Día 0 0 horas	Día 1 24 horas	Día 2 48 horas	Día 3 72 horas	Día 4 96 horas	Día 5 120 horas
0 ppm	10	10	10	10	10	10
0,3 ppm	10	10	10	10	10	10
0,6 ppm	10	10	10	10	10	10
1,2 ppm	10	10	10	10	10	10
2,4 ppm	10	10	10	10	10	10
4,8 ppm	10	10	10	10	10	10
6,1 ppm	10	10	10	10	10	10



10 ppm	10	10	10	10	10	10
20 ppm	10	10	10	10	9	9
40 ppm	10	10	8	8	7	7
80 ppm	10	10	7	7	3	1
160 ppm	10	9	9	4	2	0

Se pudo observar que a las 24 horas de iniciar el bioensayo toxicológico se da la muerte de los primeros individuos que están en los hábitats con 80 y 160ppm; entre el tercero y cuarto día se vio que hay la mayor cantidad de muerte en los terrarios; se observó además que la mortalidad entre 80ppm y 160ppm es muy parecida y llamó también la atención que hasta la concentración de 10ppm no se evidenció efectos de mortalidad en los individuos, sin embargo se pudo destacar que existe un marcado aletargamiento en los individuos de los hábitats con 6.1ppm y 10ppm.

5.4.3.1 Evaluación físico química de los terrarios

Se evidenciaron los parámetros físico-químicos más importantes en los hábitats para evitar que factores extraños afecten el normal desarrollo de la investigación creando resultados falsos positivos; en la tabla 15 se describen el promedio del análisis de los parámetros físico-químicos más relevantes el primer día de iniciada la investigación y al final de la misma.

Tabla 15. Características Físico-Químicas de los terrarios utilizados para el desarrollo del bioensayo toxicológico.

Parámetro	Día 0	Día 5
pH	7,52	7,83
Oxígeno Disuelto (ppm)	5,1	4,7
Temperatura (°C)	14,7	14,4
Cloro Residual (ppm)	0	0
Presión (Bares)	747	748
Conductividad (us/cm)	80,3	243,6

No se observó en los parámetros físico-químicos factores que pudiesen alterar la investigación, al final del desarrollo del bioensayo se evidenció además que

no existían diferencias significativas entre el análisis realizado el día 0 con el análisis del día 5 a excepción de la conductividad en donde se observa un marcado aumento que es normal debido al metabolismo propio de las larvas de la especie *Gastrotheca sp.* en los terrarios.

5.4.3.2 Bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de *Gastrotheca sp.* en 96 horas

Se realizó el análisis de los resultados presentados en 96 horas, es decir en 4 días a pesar de no tener el 100% de los individuos muertos, sino extrapolando los mismos.

Para el reporte de los resultados se elaboró una curva dosis respuesta en donde se va a relacionar la concentración de nitrito de sodio (NaNO_2) medida en partes por millón con la mortalidad de las larvas de la especie *Gastrotheca sp.* expresado en porcentaje (tanto por uno), como se observa a continuación en la figura 18; se destaca el valor de la concentración letal media que se calcula en 62,81ppm.

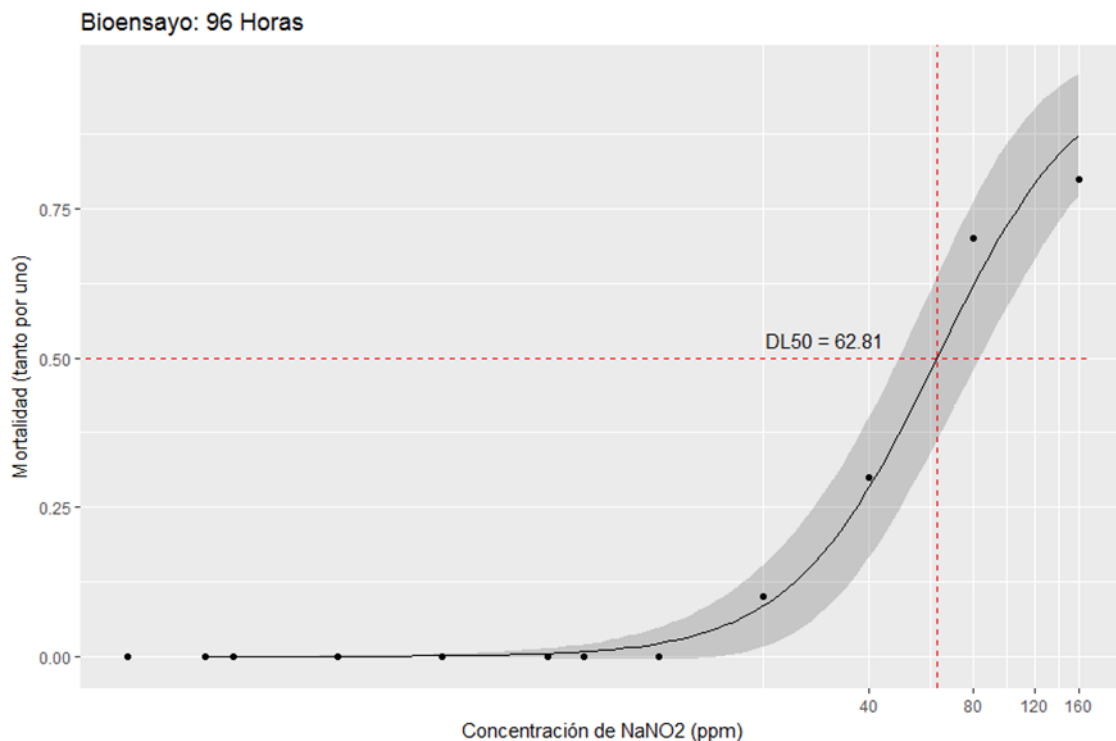


Figura 18. Curva Dosis – Respuesta del bioensayo toxicológico con nitrito de sodio frente a las larvas de *Gastrotheca sp.* en 96 horas



A partir de estos resultados se puede realizo un análisis estadístico, en donde se obtiene las dosis efectivas estimadas (intervalo de confianza del 95%) - 96h; de las se puede destacar los valores descritos en la tabla 16, utilizando los valores tanto del bioensayo toxicológico como los de duplicado en las mismas condiciones.

Tabla 16. Valores obtenidos a partir del bioensayo toxicológico del nitrito de sodio en larvas de la especie *Gastrotheca sp.* en 96 horas de ensayo.

	Valor Estimado	Error Standard	Valor Máximo	Valor Mínimo
Concentración Letal 50 (CL50) (ppm)	62.8091	8.4760	46.1964	79.4218
Concentración Letal 90 (CL90) (ppm)	181.2399	44.1812	94.6463	267.8335

A partir de la curva dosis respuesta se puede además obtener el valor de la BMDL (Concentración a la que no se observa efectos), la cual se establece en 14.45257ppm y el valor de la BMD (Concentración a la que se observa el primer efecto en las especies estudiadas), el cual se establece en 21.76663ppm; todos estos resultados obtenidos a partir de un análisis estadístico en 96 horas (4 días) de bioensayo toxicológico.

Se realizó la prueba estadística denominada “Goodness-of-fit test – 96h” obteniendo un valor p de 1, lo que indica que el modelo se ajusta a los datos ya que el valor referencial debe ser mayor a 0.05

5.4.3.3 Bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de *Gastrotheca sp.* en 120 horas

Se realizó el análisis de los resultados presentados en 120 horas, es decir en 5 días en donde ya se obtuvo un 100% de los individuos muertos en terrario donde la concentración de nitrito de sodio es de 160ppm.

Para el reporte de los resultados se elaboró una curva dosis respuesta en donde se va a relacionar la concentración de nitrito de sodio (NaNO_2) medida en partes por millón con la mortalidad de las larvas de la especie *Gastrotheca*

sp. expresado en porcentaje (tanto por uno), como se observa en la figura 19; se destaca el valor de la concentración letal media que se calcula en 42,95ppm

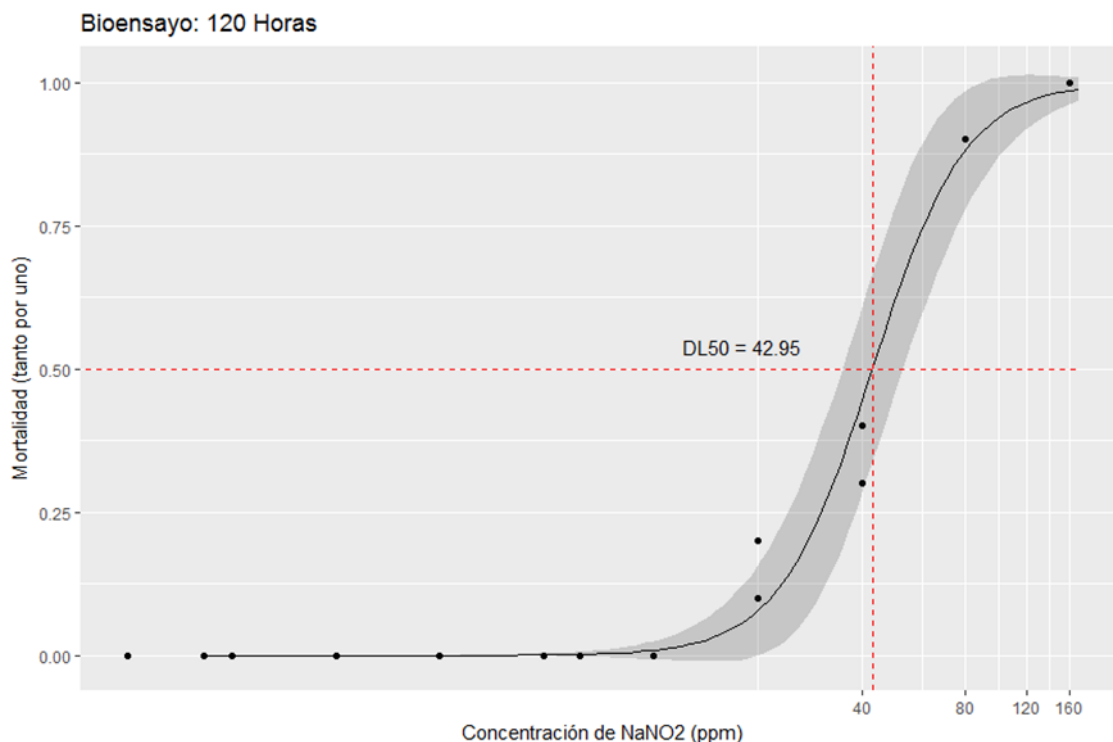


Figura 19. Curva Dosis – Respuesta del bioensayo toxicológico del nitrito de sodio frente a las larvas de *Gastrotheca sp.* en 120 horas

A partir de estos resultados se puede realizar un análisis estadístico y se destacan los valores descritos en la tabla 17, utilizando los valores tanto del bioensayo toxicológico como los de duplicado en las mismas condiciones.

Tabla 17. Valores obtenidos a partir del bioensayo toxicológico del nitrito de sodio en larvas de la especie *Gastrotheca sp.* en 120 horas de ensayo.

	Valor Estimado	Error Standard	Valor Máximo	Valor Mínimo
Concentración Letal 50 (CL50) (ppm)	42.9557	4.4414	34.2508	51.6606
Concentración Letal 90 (CL90) (ppm)	84.7790	14.0771	57.1884	112.3696

A partir de la curva dosis respuesta se puede además obtener el valor de la BMDL (Concentración a la que no se observa efectos), el cual se establece en



16.00556ppm y el valor de la BMD (Concentración a la que se observa el primer efecto en las especies estudiadas), el cual se establece en 21.76469ppm; todos estos resultados obtenidos a partir de un análisis estadístico en 120 horas (5 días) de bioensayo toxicológico.

Para determinar si los valores obtenidos tanto en el bioensayo como en el duplicado se ajustan al modelo utilizado para el análisis se realizó la prueba estadística denominada “Goodness-of-fit test – 120h” obteniendo un valor p de 1, lo que indica que el modelo se ajusta a los datos ya que el valor referencial debe ser mayor a 0.05

5.4.3.4 Comparación entre los modelos 96h-120h

Para analizar cuál de los dos modelos se ajustaban mejor a los datos obtenidos se utilizaron los criterios estadísticos AIC (Criterio de información de Akaike) y BIC (Criterio de información bayesiano), obteniendo los resultados presentados a continuación en la tabla 18.

Tabla 18. Comparación entre los modelos 96h y 120h mediante los criterios AIC y BIC

Comparación de Modelos 96 horas y 12 horas según criterios AIC & BIC		
	AIC	BIC
Modelo 96 horas	26.07762	28.43373
Modelo 120 horas	21.08487	23.44098

5.4.3.5 Relación entre la mortalidad de las larvas de *Gastrotheca sp.* con el tiempo

A pesar de que se observó mortalidad apenas a las 24 horas de iniciar con el bioensayo toxicológico, se evidenció también que de acuerdo al tiempo se incrementaba los signos que denotaban una alteración en las larvas de la especie *Gastrotheca sp.*, hasta llegar a la muerte que se produjo en todos los individuos a las 120 horas como queda descrito en la figura 20 que describe el proceso en el bioensayo realizado en las larvas de *Gastrotheca sp.* con nitrito de sodio como tóxico y en la figura 21 en donde se observa el ensayo duplicado en las mismas condiciones.

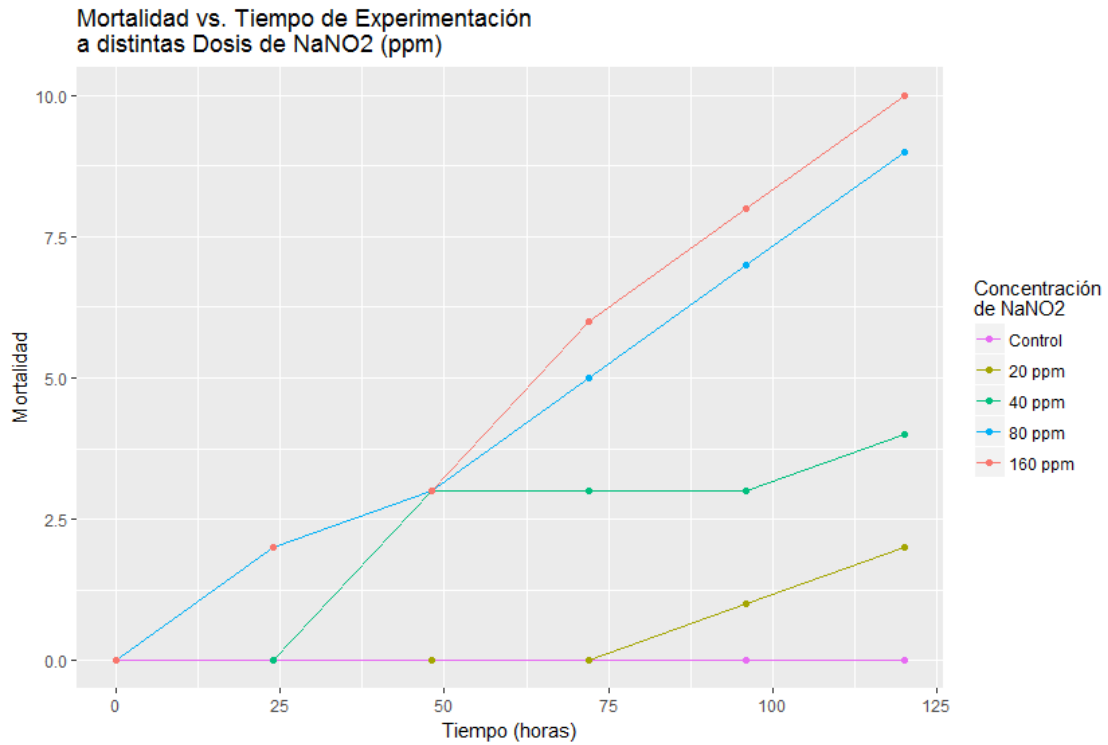


Figura 20. Mortalidad de las larvas de la especie *Gastrotheca sp.* vs. Tiempo de Experimentación a distintas dosis de NaNO₂

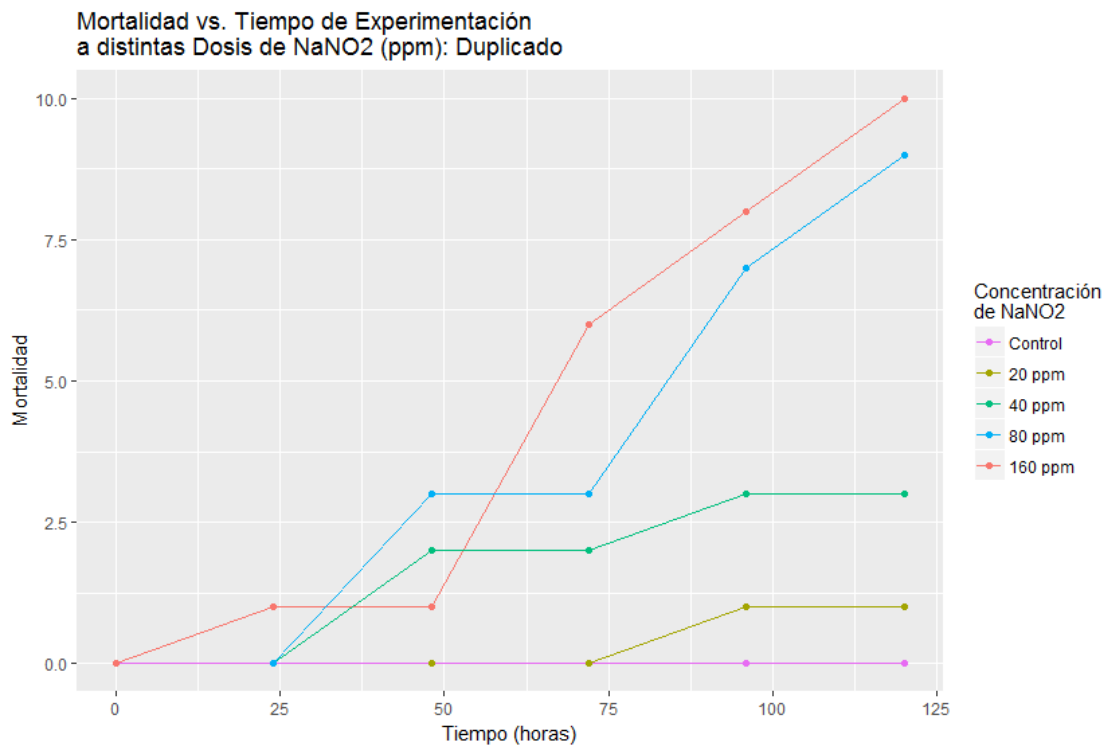


Figura 21. Duplicado del ensayo de mortalidad de las larvas de la especie *Gastrotheca sp.* vs. Tiempo de Experimentación a distintas dosis de NaNO₂



Capítulo VI

Discusión

6.1 Parámetros físico-químicos de la calidad del agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Se evidencia de forma general que la variación en los parámetros físico-químicos referentes a calidad de agua son cuantificables y estadísticamente varían entre las semanas de monitoreo, sin embargo resulta intrascendente realizar dos mediciones dentro de la misma semana, como se hizo en las campañas de monitoreo 11 y 12, puesto que los cambios son prácticamente insignificantes; incluso podría realizarse un monitoreo una vez cada quince días sin provocar alteraciones significativas en los resultados obtenidos.

No se observó relación directa de ninguna de las variables analizadas con aquellas pozas en donde se evidenciaron anfibios que fueron las pozas PAR1, YAN2, y TAR3, ya que se encontró ranas en pozas con registros altos y bajos de nitritos, nitratos, OD, de temperatura del agua y conductividad, manteniéndose el pH entre los mismos rangos para la mayoría de pozas, a pesar de esto, no se puede concluir con certeza la afeción de estas variables sobre determinada especie de anfibio sin la correlación del monitoreo biológico así como posibles bioensayos que permitan cuantificar los valores o concentraciones máximas o mínimas que toleran los anfibios para cada variable.

Se puede determinar el estado de una poza artificial en relación a la calidad de agua, por ejemplo en la poza YAN1, la ubicación alejada del movimiento de transeúntes da lugar al uso de la misma, ya que esta poza fue usada como depósito de basura, degradando no solamente el aspecto de la poza, sino la calidad del agua de este hábitat, haciendo de esta poza un lugar inhabitable por ninguna especie de las que se busca proteger.

Un aspecto a tomar en cuenta en la poza PAR2 cuya coloración del agua imposibilitó completamente el análisis de nitritos y nitratos durante el monitoreo, es la caracterización de la misma, por lo que realizar un análisis completo de la misma se vuelve indispensable, debido a que sus propiedades difieren mucho



del resto de pozas y se debería encontrar los motivos; entre los cuales se observa factores como la presencia de eucaliptos alrededor, la ubicación de la poza a la sombra u otras variables químicas como la presencia de hierro.

6.1.1 pH de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Si consideramos que los “Valores Referenciales según los criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulces frías o cálidas, en aguas marinas y de estuarios”, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA son de 6, 5 a 9, 5, podemos concluir contundentemente que el pH encontrado en las pozas artificiales creadas para la conservación de especies de anfibios cumple con los parámetros exigidos en la legislación ecuatoriana y no causarían ningún daño a las especies que se desarrollen en este ecosistema acuático.

La organización ZOOAcuariums indica que el problema de los cambios drásticos de pH es la aparición de sustancias o sales extremadamente ácidas o básicas que en concentraciones considerables han demostrado un efecto tóxico sobre la flora y fauna que se desarrolla en el medio acuático (Reforesta, 2007), situación que en la pozas analizadas no ocurre debido a que al menos durante las campañas de monitoreo no se observó alteraciones marcadas en los valores de este parámetro.

Estadísticamente no se encontró diferencias significativas en los valores de pH respecto al tiempo que duro el estudio, tampoco se encontraron diferencias de acuerdo a los sectores en donde se encontraban ubicadas las pozas, debido principalmente que los factores que influyen sobre esta variable no condicionaban de ninguna manera cambios significativos.

6.1.2 Conductividad de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

La conductividad de las pozas varía entre 186,9 y 378 $\mu\text{s}/\text{cm}$ con un promedio de 266,16 $\mu\text{s}/\text{cm}$, lo que se puede considerar normal debido a que se tiene un ecosistema con una gran cantidad de flora y fauna que en su metabolismo normal va a generar sales y iones que aumentan considerablemente los



valores de conductividad sin que esto indique una alteración alarmante en la calidad de agua de las pozas.

En las pozas con presencia de anfibios (PAR1, YAN2 y TAR3) se presentó un promedio de conductividad de 263,92 $\mu\text{s}/\text{cm}$, rodeando el promedio general; lo que indica que no se va a evidenciar problemas en el desarrollo ni supervivencia de los anfibios.

Se observa también que la única poza que presentó una disminución progresiva de la conductividad fue TOM2 mientras que de forma general en el resto de pozas se evidencia un aumento mínimo de los valores de conductividad; aunque la mayoría de pozas presentaron algas, esto no se ve reflejado en aumentos considerables de conductividad.

Como se esperaba la conductividad varía mucho a lo largo del estudio, observándose un aumento en los valores progresivo, esto se debe principalmente al aumento de la vegetación y la actividad metabólica que se da en los ecosistemas acuáticos; además se evidenció la influencia del sector en los valores de conductividad, esto debido al crecimiento desmedido de vegetación e insectos que se dio en determinadas zonas y que no fue común para todas las pozas.

6.1.3 Temperatura del Agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Aunque los “Valores referenciales según los criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulces frías o cálidas, en aguas marinas y de estuarios”, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA son en condiciones naturales: 20°C +/- 3°C (TULSMA, 2010), debe considerarse que las especies que se busca conservar están completamente adaptadas tanto a la altitud como a la temperatura del medio, se puede ser un poco más flexible en cuanto al rango de estos valores referenciales.

En el presente estudio se realizaron las mediciones en diferentes horas del día debido a la imposibilidad de recorrer todas las pozas en un tiempo no menor a



3 horas por lo que se observa que la temperatura en las pozas varía entre 13,8°C y 20,9°C.

También es necesario considerar factores que aumentan o disminuyen la temperatura del agua como la ubicación de pozas las cuales estaban en algunos casos a la sombra y se registraron menores valores de temperatura como el caso de PAR2 (15,13°C), lo que se diferencia mucho de otras pozas que presentan mayores promedios, considerando que se encuentra bajo directa influencia de radiación solar como es el caso de TOM2 (18,68°C).

Desde el punto de vista estadístico se dieron diferencias en los valores de temperatura a lo largo del desarrollo de la investigación, esto debido a una clara fluctuación en el clima dentro de los tres meses, esto se comprueba debido a que no hay influencia del sector donde se ubican las pozas con respecto a los valores obtenidos de temperatura.

6.1.4 Oxígeno Disuelto de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Considerando que los “Valores referenciales según los criterios de calidad de aguas para la preservación de flora y fauna en agua dulces frías o cálidas, en aguas marinas y de estuarios”, inscritos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA son: No menor a 5mg/L para (TULSMA, 2010); para la concentración de oxígeno disuelto ninguna de las pozas cumplió con la normativa.

Las fluctuaciones durante las campañas de monitoreo pueden deberse a distintos factores entre los cuales se pueden enumerar primeramente la efecto estacional (falta de lluvia) durante los primeros meses donde se realizaron las campañas de muestreo que traía como consecuencias un disminución de niveles de agua y obviamente una caída en las concentraciones de oxígeno.

A medida que transcurre el tiempo se observa además la presencia de flora acuática que va a oxigenar las pozas mediante el proceso de fotosíntesis, sin embargo estas mismas plantas en exceso podrían provocar eutrofización del ecosistema acuático (Capó Martí, 2007); por lo que se debe controlar minuciosamente las condiciones de estos hábitats.



Las pozas YAN1, PAR2 y TAR3 con 1,6 mg/L (21,53%), 0,93 mg/L (12,57%) y 1,03 mg/L (14,11%) respectivamente; son valores que se deben tomar en cuenta debido a lo bajos que resultan para un hábitat que pretende conservar algunas especies protegidas.

La variación en los valores de oxígeno disuelto con respecto al tiempo se puede evidenciar claramente en especial en las semanas 6, 11 y 12; el aumento de la concentración de oxígeno en el agua de las pozas es debido a las precipitaciones dadas los días previos e incluso durante los muestreos en dichas semanas, es por esta razón que estadísticamente no existe variación alguna de los valores del oxígeno disuelto con respecto al sector donde están ubicadas las pozas.

6.1.5 Concentración de Nitritos y Nitratos de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Según el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente o TULSMA, los valores referenciales para los nitritos y nitratos son de 0,06mg/L y 10mg/L, tomando en cuenta los criterios de calidad de agua los nitratos estarían dentro de los valores referenciales límite descritos en la normativa nacional vigente (TULSMA, 2010).

Con los nitritos se manejaron valores que van desde 0,000 mg/L hasta 0,105 mg/L con un promedio general de 0,0051 mg/L, observándose un incremento en la concentración de los mismos a medida que avanzan las campañas de monitoreo; un proceso que se considera normal si tomamos en cuenta el desarrollo de especies de flora y fauna en estos ecosistemas que van a elevar la cantidad de nutrientes incluyendo a los nitritos en las pozas como es el caso de las algas que se observaron en la superficie de la mayoría de las pozas.

En vista de este aumento en la concentración de nitritos se considera necesario la realización de un bioensayo toxicológico que permita evidenciar los límites máximos de este compuesto en las pozas, de manera que no cause ninguna afección a las especies que se busca conservar, en especial a la rana marsupial azuaya *Gastrotheca sp.*



Para el caso de los compuestos nitrogenados nitritos y nitratos estos aumentan a medida que transcurre el presente estudio, lo que se comprueba estadísticamente; algo que se puede considerar normal x los procesos metabólicos desarrollados en el interior de la pozas, sin embargo los valores a partir de la semana 7 empiezan a estar muy cerca del límite permitido en el TULSMA, por lo que se debe ser cuidadoso con los procesos de eutrofización que pudieran desarrollarse en los ecosistemas artificiales.

6.2 Bioensayo toxicológico de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp.*

Como se mencionó anteriormente se realizó un bioensayo toxicológico con concentraciones ascendentes de nitrito de sodio sobre la especie de anuro *Gastrotheca sp.* conocido como rana marsupial azuaya debido a que parte de los objetivos de la creación de las 10 pozas artificiales como hábitats para protección de anfibios es la conservación de esta especie; sin embargo resulta difícil la comparación de este ensayo con otros realizados por otros autores debido principalmente a que esta especie de rana se está redescubriendo y encontrar información al respecto es bastante complicado por lo que se debe realizar una comparación con estudios realizados con tóxicos principalmente aquellos derivados del nitrógeno en distintas especies de anfibios.

6.2.1 Estado de las larvas de *Gastrotheca sp.*

Se evidencia como una característica fundamental para considerar sano a un renacuajo la presencia del aparato bucal completo, en aquellos en los que no existe el desarrollo del mismo se ha observado una marcada dificultad para realizar metamorfosis o si se la realiza, la vida como un individuo adulto no dura mucho; bajo este criterio se eligieron como especímenes para el desarrollo del bioensayo.

6.2.2 Necropsias en las larvas de *Gastrotheca sp.*

La necropsia en las larvas que morían en el bioensayo toxicológico evidenció la muerte de los individuos de los terrarios 9, 10 y 11 que corresponden a aquellos con mayores concentraciones de nitrito de sodio en solución acuosa,



indicando de forma clara que la muerte de estas larvas se dio por la presencia del tóxico en su hábitat.

Se reportaron en los cadáveres la presencia las hileras de dientes completas sin evidencia de lesiones macroscópicas aparentes a nivel de piel y se encontraron zonas hemorrágicas en hígado e intestino, lo que indica que el efecto del tóxico se da a este nivel, pudiendo analizarse los órganos en busca del tóxico en casos en donde se sospeche de la elevada concentración de nitritos como responsable de muerte de especies de anfibios.

La intoxicación se produce de forma rápida ya que se ven a ver afectados órganos internos importantes como el hígado y el sistema digestivo, provocando alteraciones a nivel sanguíneo, aletargamiento con disminución de la movilidad y finalmente la muerte.

6.2.3 Mortalidad de las larvas de la especie *Gastrotheca sp.*

A pesar de que la presente investigación analiza el efecto toxicológico agudo del nitrito de sodio sobre las larvas de *Gastrotheca sp.* en términos de mortalidad de los especímenes, es importante destacar que aunque no se produjo la muerte en los individuos durante los 120 horas que duró el bioensayo en los terrarios que tenían concentraciones de 6,1ppm y 10ppm se observó un claro efecto de aletargamiento y disminución en la movilidad al finalizar el ensayo con respecto a su estado cuando se inició el mismo; efecto que iba disminuyendo notoriamente a medida que se observaba los terrarios con menor concentración del tóxico, por lo que se puede reportar este efecto como un signo evidente de un problema de intoxicación para la especie de anfibio estudiada.

Se empezó a observar efectos de mortalidad en los terrarios que contenían una concentración de 20ppm a las 96 horas del desarrollo del bioensayo, siendo este el caso en el que se reportó la muerte con menor concentración de tóxico; así mismo se observó la muerte del primer espécimen a las 24 horas de iniciar el bioensayo en el terrario que tenía una concentración de 160ppm, siendo el caso en el que se reportó la muerte de un individuo a causa del tóxico en menor tiempo.



En el estudio se observa la muerte más acelerada de los individuos en los terrarios con concentraciones de 80ppm y 160ppm, difiriendo del resto de pozas en donde se veía un aletargamiento y disminución de la movilidad antes de la muerte de los especímenes, en estos terrarios se puede ver un aumento exponencial de las muertes a causa del tóxico, llegando a tener valores muy similares al final del ensayo.

6.2.4 Bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de *Gastrotheca sp.* en 96 horas

Se reportaron los resultados a las 96 horas de realizado el estudio a pesar de no tener la mortalidad del 100% de los individuos, debido a que muchos de los estudios tomados de base para la presente investigación establecían que este es el tiempo ideal para observar los efectos toxicológicos agudos, obteniendo algunos resultados importantes.

Si bien el análisis estadístico nos permite observar valores de los parámetros más importantes como la CL50 que fue de 62,8091ppm y la CL90 que es de 181,2399ppm; estos valores no son del todo certeros, debido a que el ensayo trabajó máximo con un terrario que tenía una concentración de 160ppm en donde ya se obtuvo mortalidad de todos los individuos.

Los valores de BMDL y BMD presentan resultados muchos más cercanos a la realidad que se obtuvo en el bioensayo toxicológico; debe considerarse que al momento de realizar el ensayo todavía el terrario con concentración de nitrito de sodio de 40ppm todavía tenía 7 individuos vivos, la de 80ppm tenía 3 individuos vivos y la de 160ppm tenía 2 individuos vivos, coincidentemente los resultados en el primer bioensayo realizado y en el duplicado fueron los mismo, lo que evidenciaba que el análisis todavía no se encontraba concluido.

6.2.5 Bioensayo toxicológico con nitrito de sodio en larvas de *Gastrotheca sp.* en 120 horas

Se reportaron los resultados a las 120 horas de realizado el estudio en donde se obtuvo la mortalidad del 100% de los individuos, en esta instancia se considera que en bioensayo toxicológico ha concluido y los resultados que se



van a obtener a partir de hacer el análisis estadístico van a corresponder al estudio realizado bajo las condiciones que se establecieron desde un principio.

El análisis estadístico nos brinda los resultados de los parámetros más importantes como la CL50 que fue de 42,9557ppm y la CL90 que es de 84,7790ppm; estos valores son mucho más confiables que los obtenidos a las 96 horas y coinciden con los que se pueden observar en el gráfico de dosis respuesta, por lo que estos valores corresponden de manera concreta al ensayo realizado.

Los valores de BMDL y BMD presentan resultados muy cercanos a los obtenidos del bioensayo a las 96 horas, debido a que el inicio del bioensayo toxicológico es el mismo en ambos casos, difiriendo simplemente en el tiempo de la finalización del mismo.

Al momento de realizar el ensayo todavía el terrario con concentración de nitrito de sodio de 40ppm todavía tenía 6 individuos vivos, la de 80ppm tenía 1 individuo vivo y la de 160ppm no tenía individuos vivos, lo que evidenciaba que el análisis todavía se debía concluir en este punto.

6.2.6 Comparación con estudios similares

Comparando los valores reportados en estudios similares con los obtenidos en la presente investigación observamos que los valores de toxicidad aguda distan mucho de los resultados descritos en investigaciones previas, esto debido a un gran número de factores de los cuales se destacan principalmente la variación de la especie estudiada que demostró una gran resistencia a concentraciones relativamente bajas del tóxico, por lo que se debió ajustar las concentraciones para obtener los resultados descritos anteriormente.

Tomando como referencia las hojas de seguridad del nitrito de sodio, se ha obtenido resultados en bioensayos toxicológicos con otras especies como la trucha arcoíris con una CL50 de 0,19mg/L en 96 horas de ensayo, para la especie *Daphnia magna* se tiene una CE50 que va desde 12,5 a 100mg/L, en la rata la DL50 es de 85mg/kg de peso corporal y en el presente estudio en la especie *Gastrotheca sp.* una CL50 de 42,95mg/L; observándose una gran



diferencia entre las distintas especies sometidas al mismo tóxico (Grupo Transmerquin, 2014; Merck, 2015; Roth, 2016).

Todos los valores referenciales que se han obtenido en investigaciones previas deben ser tomados en cuenta debido a que estos nos permiten observar el grado de susceptibilidad o resistencia que tienen determinadas especies a un tóxico en particular, que en la mayoría de casos varía mucho con respecto a la evaluación de otro tóxico u otra especie (Alea, 2003; Alonso, 2016); por lo que la evaluación de un bioensayo debe ser exclusiva tanto para la especie en la que se hizo el análisis así como para el tóxico que se utilizó de referencia.



Capítulo VII

Conclusiones

7.1 Parámetros físico-químicos de calidad de agua de las pozas artificiales implementadas para recuperar la especie *Gastrotheca sp*

Para todas las pozas analizadas se tiene un promedio general de pH de 7,87 con un valor máximo de 8,09 y un mínimo de 7,52 sin observar cambios sustanciales en las mismas; en cuanto a la temperatura el promedio de las pozas es de 16,07°C con un rango que varía entre 13,8°C y 20,9°C, debido a la variación en la hora de toma de muestra para cada poza; en la variable oxígeno disuelto se encuentra un promedio de 3,11mg/L en todas las pozas con un amplio rango que varía entre 0,96mg/L y 5,3mg/L, valores que se observa que fluctúan bastante de acuerdo a la cantidad de agua y al clima en general; para la variable de conductividad se tiene un valor promedio en las pozas de 266,26us/cm con valores máximos y mínimos de 186,9us/cm y 378us/cm respectivamente con un ligero aumento a medida que avanzan la campañas de monitoreo.

En el caso de los nitritos y nitratos se obtuvieron valores que a medida que avanzan las campañas de muestreo van aumentando, para los nitratos se tiene un promedio de 0,68mg/L para las pozas analizadas con un rango que varía entre 0,28mg/L y 0,85mg/L, que están dentro de los valores referenciales en la normativa nacional vigente, para los nitritos se observó que había un promedio de 0,0051mg/L en las pozas analizadas con valores máximos y mínimos de 0,00mg/L y 0,105 respectivamente; el aumento de estas variables en algunas pozas nos lleva a la realización de un bioensayo toxicológico.

En general se puede decir que en las pozas a pesar de no contar con todas las especificaciones en cuanto a la calidad de agua, los parámetros alterados no van a ser determinantes para el desarrollo, reproducción o supervivencia de anfibios y constituyen una excelente alternativa como hábitat para la conservación de especies de flora y fauna.

Desde el punto de vista estadístico los valores de Conductividad, Temperatura, Oxígeno Disuelto, Nitritos y Nitratos varían de forma significativa con respecto



al tiempo en el que se desarrolla la investigación, por otra parte tan solo en los valores de Conductividad se evidencian cambios significativos respecto al sector en el cual fueron construidas las pozas.

7.2 Bioensayo Toxicológico con nitrito de sodio en larvas de *Gastrotheca sp*

Se reportaron los resultados obtenidos a las 96 y 120 horas, obteniendo en el primer caso una concentración letal medio (CL50) de 62,81ppm, una concentración letal 90 (CL90) de 181,23ppm, una BMDL de 14.45ppm y una BMD de 21.76ppm; mientras que para el ensayo en el que se reportaron los datos a las 120 horas se obtuvieron valores de concentración letal medio (CL50) de 42,95ppm, una concentración letal 90 (CL90) de 84,77ppm, una BMDL de 16.00ppm y una BMD de 21.76ppm, coincidiendo mucho estos dos últimos valores a los obtenidos a las 96 horas.

Aunque ambos modelos se acoplan a los datos, el ensayo que duró 120 horas describe mucho mejor el fenómeno ocurrido in vitro, además que cumple con todos los requisitos para la realización de bioensayo, por lo que se establecen estos resultados como los más aceptables para las condiciones aplicadas en la realización de este bioensayo toxicológico.

7.3 Recomendaciones

Se recomienda que en los puntos en donde se ubiquen pozas artificiales para conservación de especies de anfibios, se realicen campañas de concientización de la gente para que tomen en sus manos la labor de cuidado hacia estos sitios de rescate, y que no suceda por el contrario que las dañen como fue el caso de algunas pozas en las que se pudo observar un completo abandono y destrucción de las mismas.

Además es recomendable tomar en cuenta los valores de radiación solar, que registra cada uno de los hábitats, ya que esta variable puede incidir en gran medida en la necesidad de sitios para refugio de los anfibios; como alternativa se podría analizar a nivel macro, del clima de la ciudad, considerando que los valores serían buenos estimaciones.



Para establecer valores referenciales de las variables analizadas en el marco de la conservación de muchas de las especies protegidas de anfibios, se recomienda la realización de bioensayos en donde se varíen las condiciones de mencionadas variables y se evalúe el comportamiento de las especies analizadas; además es recomendable también continuar la presente investigación observando el comportamiento de las larvas de la especie *Gastrotheca sp.* desde el punto de vista crónico a concentraciones incluso menores a las utilizadas en esta investigación.



Bibliografía

1. Abad L., Mejía D., León P., Cárdenas I., Pacheco B. & Tonon M. (2016). *Calidad del Agua y Variables Ambientales en Hábitats para Anfibios Amenazados en la Zona Urbana de Cuenca*. Cuenca, Ecuador: Revista de la Facultad de Ciencias Químicas – Universidad de Cuenca.
2. Agostini G. (2013). *Ecotoxicología de Anfibios en agroecosistemas de noreste de la región Pampenea*. La Plata, Argentina.
3. Aguilera C., Arias H & Adriana L. (2016). *Evaluación de la Calidad del Agua de Lluvia para su Aprovechamiento y uso Doméstico en Sitios Estratégicos de la Ciudad de Guanajuato*. Guanajuato, México.
4. Akram M. (2009). *Calculation of LD50 values from the method of miller and Tainter, 1944. J Ayub Med Coll Abbottabad 2009;21(3)*
5. Alea M., Carballo O., Trujillo J. & Torres A. (2003). *Sulfato de Cobre como sustancia de referencia en ensayo de toxicidad en larvas de rana cubana Osteopilus septentrionalis*. Habana, Cuba: Sertox ©
6. Alea M., Carballo O., Trujillo J. & Torres A. (2004). *Toxicidad aguda del Herbicida químico Glifosan en larvas de la rana cubana: Osteopilus septentrionalis*. Habana, Cuba: Sertox ©
7. Alonso A. (2016). *Cálculo de las concentraciones letales 50 (CL50) a 96 horas para la toxicidad del nitrito en dos especies de invertebrados de agua dulce Eulimnogammarus toletanus y Polycelis felina*.
8. Amador Oyola, L. A. (2016). *Fauna urbana de Guayaquil: el caso de los anfibios y reptiles, nuestros vecinos menospreciados*, 4(70), 1–8.
9. AMARU, 2013. *Monitoreo y Reubicación de los Anfibios Amenazados del Área Urbana De Cuenca: Informe final*. 33pp.
10. Angulo A., Rueda V., Rodríguez J. & Lamarca E. (2006). *Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina*. Bogotá, Colombia: Conservación Internacional
11. Arbeláez E, Vega D. Aspectos del desarrollo larval de Gastrotheca litonedis, 1987 (anura: hemiphractidae) en cautiverio. 2014. Tesis de Licenciatura. Universidad del Azuay.



12. Báez J., Romero D., Ferri F. (2013). *Ranas, sapos y científicos*. Málaga, España: Encuentros en la Biología, 6: 142
13. Barbadillo L. (1999). *Anfibios y reptiles de la península Ibérica, Baleares y Canarias*. Barcelona, España: Ed Planeta
14. Barberá J., Ayllón E., Trillo S., & Astudillo G. (1999). *Atlas provisional de distribución de los anfibios y reptiles de la provincia de Cuenca*. Cuenca, España: Zool. baetica, 10: 123-148
15. Beamonte E., Casino A., Veres E. & Bermudez J. (2004). *Un indicador global para la calidad del agua. Aplicación a las aguas superficiales de la Comunidad Valenciana*. Valencia, España. Estadística Española Vol. 46, Núm. 156, 2004, págs. 357 a 384
16. Benitez M. (2016). *Análisis de los hábitats acuáticos de la cuenca mediterránea andaluza y su importancia para los anfibios mediante el uso de modelos espaciales*. Granada, España
17. Berner E., Berner R. (1987). *The Global Water Cycle Geochemistry and Environmental*. New Jersey, Estados Unidos: Ed Prentice Hall
18. Brambilla J. (2003). *Métodos y técnicas de manejo y conservación para anfibios y reptiles en campo: análisis, evaluación y aprovechamiento sustentable*. México DF, México.
19. Cabrera E., Hernández D., Gómez H & Cañizares M. (2003). *Determinación de nitratos y nitritos en agua. Comparación de costos entre un método de flujo continuo y un método estándar*. Nuevo León, México: Revista de la Sociedad Química de México, Vol. 47, Núm. 1 (2003) 88-92
20. Capó Martí M. (2007). *Principios de Ecotoxicología*. Madrid, España: Ed. Tébar SL
21. Carter L. (2008). *Manual de Evaluación del Impacto Ambiental*. Madrid, España: McGraw-Hill
22. Coppo J. (2003). *El medio interno de la "rana toro" (Rana catesbeiana, Shaw 1802)*. Revisión bibliográfica. Corrientes, Argentina: Rev. Vet. 14: 1, 2003



23. Duellman W., Catenazzi A, & Blackburn D. (2011). *A new species of marsupial frog Anura: Hemiphractidae: Gastrotheca from the Andes of southern Peru*. Kansas, USA: Zootaxa 3095: 1–14
24. Escanta V. (2007). *Manejo en semicautiverio de la rana marsupial andina Gastrotheca riobambae para educación ambiental en el jardín botánico de Quito*. Quito, Ecuador.
25. Figueroa R., Valdovinos C., Araya E. & Parra O. (2003). *Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad de agua de ríos del sur de Chile*. Concepción, Chile: Revista Chilena de Historia Natural 76: 275-285, 2003
26. Fioranelli S., Barboza N., Mussart G & Coppo, J. (2005). *Cambios ontogénicos del medio interno de Rana catesbeiana*. Corrientes, Argentina.
27. Gonzales, J. (2002). *Colección de Anfibios y Reptiles. In: Catálogo de las Colecciones Zoológicas de Asia del Museo Nacional de Ciencias Naturales, III: Vertebrados: 61-180* Manuales técnicos de Museología. Vol. 13. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid.
28. González H. *Preferencia de hábitats y diversidad morfológica de las ranas marsupiales (Gastrotheca spp) en el área urbana del Cantón Cuenca, Provincia del Azuay*. 2011. Tesis de Licenciatura. Universidad del Azuay.
29. Grupo Transmerquin (2014). *Hoja de seguridad Nitrito de sodio*
30. Guayasamin J., Bonaccorso E. (2004). *A new species of glass frog (Centrolenidae: Cochranella) from the lowlands of northwestern Ecuador, with comments on the Cochranella granulosa group*. Herpetologica 60: 485–494
31. IUCN 2017. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. <<http://www.iucnredlist.org>>.
32. Izaguirre M., Marín L., Vergara M., Lajmanovich R., Peltzer P. & Casco V. (2006). *Modelos experimentales de anuros para estudiar los efectos de piretroides: Ciencia, Docencia y Tecnología N° 32, Año XVII, mayo de 2006*
33. Kerry L. & Griffis K. (2005). *Ontogenic Delays in effects of nitrite exposure on tiger salamanders Ambystoma tigrinum tigrinum and Wood*



- Frogs Rana Sylvatica*. New York, USA: Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 24, No. 6, pp. 1523–152
34. Kerry L. & Griffis K. (2007). *Sublethal effects of nitrite on eastern tiger salamander *Ambystoma tigrinum tigrinum* and wood frog *Rana sylvatica* embryos and larvae: implications for field populations*. Las Cruces, USA. *Aquat Ecol* (2007) 41:119–127
 35. Lips K. y Reaser J. (1999). *El monitoreo de anfibios en América Latina*: The Nature Conservancy
 36. Marco A. & Blaustein A. (1999) *The Effects of nitrite on behavior and metamorphosis in cascades frogs *Rana cascadae**. Salamanca, España: Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 18, No. 5, pp. 946–949.
 37. Marco A. (2002). *Contaminación global por nitrógeno y declive de anfibios*. Madrid, España: Rev. Esp. Herp. (2002): 97-109
 38. Massol A. (2000). *Biorremediación: de una realidad social a una solución ecológica* Segunda edición. Puerto Rico
 39. Matthias U. % Moreno H. (1983). *Estudio de Algunos parámetros físicoquímicos y biológicos en el río Medellín y sus principales afluentes*. Medellín, Colombia
 40. Merck. (2015). *Hoja de seguridad Nitrito de sodio*
 41. Moreno L. & Rodríguez G. (2013). *Guía de iniciativas locales para los anfibios*. Madrid, España: WWF organization.
 42. Muñoz H., Armienta A. & Cenicerros M. (2004). *Nitrato en el agua subterránea del valle de Huamantla*. Tlaxcala, México: Rev. Int. Contam. Ambient. 20 (3) 91-97, 2004
 43. Norma NTE-INEN 2176 (1998): *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo*
 44. Pacheco P. (2015). *Evaluación del ciclo reproductivo de la rana marsupial andina (*gastrotheca riobambae*) en jaulas exteriores en el Centro Experimental Académico Salache*. Cotopaxi, Ecuador
 45. Pauta G. (2014). *Estudio integral de la calidad del agua del río Burgay*. Cuenca, Ecuador: Maskana
 46. Poole V, & Shelly G. (2008). *Guía para el manejo de anfibios en cautiverio*. México DF, México, ATAG.



47. Quisphe P. (2016). *Caracterización histopatológica de órganos afectados por el síndrome de edema en ranas de la especie Gastrotheca spp. Provenientes de cautiverio de la institución balsa de sapos*. Quito, Ecuador.
48. Ramírez S. (2015). *Observaciones sobre la historia natural de Erythrolamprus epinephelus albiventris*. Quito, Ecuador
49. Reforesta. (2007). *Manual de creación de Charcas para anfibios*. Madrid, España
50. Rice K., Mazzotti F., Hardin J & Conill M. (2014). *Uso de Anfibios como Indicadores del Éxito de la Restauración de Ecosistemas*. Florida, USA: Wildlife Ecology and Conservation
51. Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D. (2015) *Dose-Response Analysis Using R PLOS ONE*, 10(12), e0146021
52. Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A. y Nicolalde, D. A. (2016). AmphibiaWebEcuador. Version 2016.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador
53. Roth. (2016). *Hoja de seguridad Nitrito de sodio*
54. Samboni N., Carvajal J. & Escobar J. (2007). *Revisión de parámetros fisicoquímicos como indicadores de calidad y contaminación del agua*. Revista ingeniería e investigación vol. 27 no.3, diciembre de 2007 (172-181)
55. Sanchez, A. (2015). *Descripción y conservación de una población urbana de Discoglossus galganoi*.
56. Sanz Sánchez F. (1974). *Sentido y Posibilidades de la Toxicología Ambiental*. Discurso de Apertura del Curso Académico. UCM
57. Sardiñas O., Chiroles S, Fernández M, Hernández & Pérez A. *Evaluación físico-química y microbiológica del agua de la presa El Cacao*. Cotorro, Cuba: Higiene y Sanidad Ambiental, 6: 202-206
58. Shinn C., Marco A. & Serrano L. (2013). *Influence of low levels of water salinity on toxicity of nitrite to anuran larvae*. Sevilla, España: SciVerse ScienceDirect
59. Siavichay F., Maldonado G & Mejía D. (2016). *Anfibios urbanos de Cuenca*. Cuenca, Ecuador



60. Silva J., Torrejón G., Bay-Schmith E. & Larrain A. (2003). Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (crustacea: cladocera) usando un tóxico de referencia. Coquimbo, Chile: *Gayana* 67(1): 87-96, 2003
61. Simon, J. A., Snodgrass, J. W., Casey, R. E., & Sparling, D. W. (2009). *Spatial correlates of amphibian use of constructed wetlands in an urban landscape*. *Landscape Ecology*, 24(3), 361–373.
62. *Standard Methods para análisis de Agua*, 2010
63. *Standard Methods para análisis de Agua*, adaptados por la marca HACH® según el método 8039
64. *Standard Methods para análisis de Agua*, adaptados por la marca HACH® según el método 8507
65. Tapia R. % Trujillo C. (2011). *Título del proyecto Caracterización e identificación de la diversidad biológica para determinar indicadores de calidad de hábitat en suelos y agua de páramo y bosques de la Cordillera Noroccidental de los Andes, Zona 1*. Quito, Ecuador.
66. *Texto Unificado de Legislación Secundaria al Medio Ambiente TULSMA. Libro VI anexo I: Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario*. (2006)
67. Torres P., Cruz C. & Patiño P. (2009). *Índices de calidad de agua en fuentes superficiales utilizadas en la producción de agua para consumo humano. Una revisión crítica*. Medellín, Colombia.
68. Urgilez P. (2016). *Control de calidad de agua y análisis de sedimentos en la microcuenca del río Tabacay*. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca
69. Yáñez M. & Herrera M. (2009). *Monitoreo de anfibios en la reserva biológica Yanacocha (distrito metropolitano de Quito)*. Quito, Ecuador.
70. Yáñez M. (2005). *Diversidad y estructura de once comunidades de anfibios y reptiles de los Ecuador*. Quito, Ecuador: ResearchGate



71. Yáñez M., Bejarano P. & Herrera M. (2009). *Monitoreo de anfibios en el bosque protector Mashpi (distrito metropolitano de Quito)*. Quito, Ecuador.
72. Yáñez M., Ramos P., Altamirano M. & Castro C. (2010). *Estado poblacional de una de rana nodriza Anura: Dendrobatidae: Hyloxalus delatorrae, críticamente amenazada, en los Andes Norte de Ecuador*. Quito, Ecuador: Serie Zoológica 6: 38-64
73. Yáñez M., Sánchez J., López K., Rea E., Oyagata C. & Guerrero P. (2014). *Ampliaciones del rango de distribución de algunas especies de anfibios y reptiles en el suroccidente de Ecuador*. Quito, Ecuador.
74. Zaracho V., Céspedes J. & Álvarez B. (2005). *Aspectos reproductivos de Anfibios de las provincias de Corrientes y Chaco*. Tucumán, Argentina: Insugeo, 14: 417 – 426

Anexos

Anexo 1: Reconocimiento de las pozas



PAR1



TOM1



PAR2



TAR1



TAR2



TAR3



TOM2



YAN1



YAN2

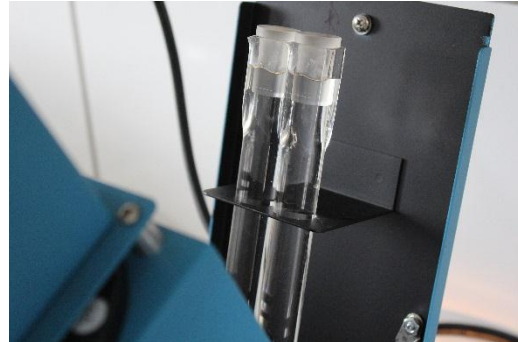


YAN3

Anexo 2: Análisis de Laboratorio



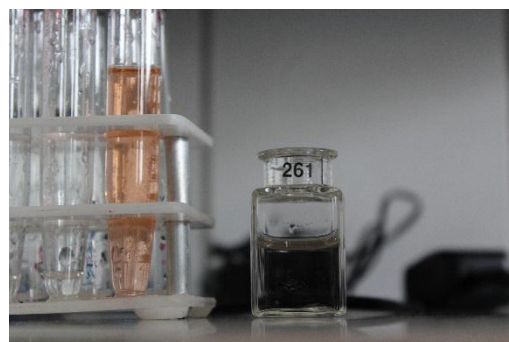
Filtración muestras previo a análisis



Determinación de color poza PAR2

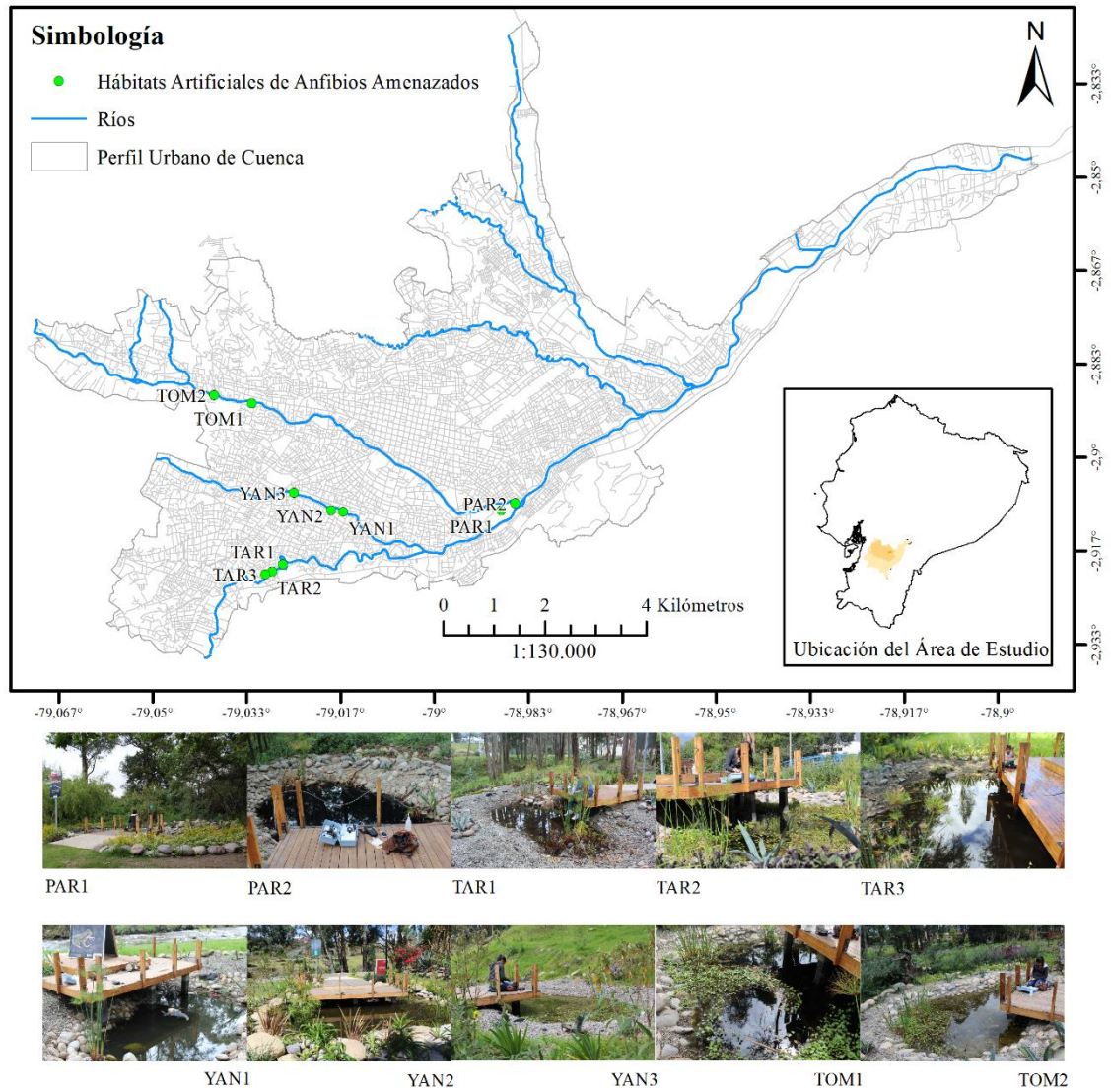


Análisis muestras en el laboratorio



Determinación de Nitritos

Anexo 3: Mapa de Ubicación de las pozas





Anexo 4: Ficha de monitoreo en campo para hábitats de anfibios amenazados.

MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA Y VARIABLES AMBIENTALES EN LOS HÁBITATS PARA LOS ANFIBIOS AMENAZADOS EN LA ZONA URBANA DE CUENCA	
ID Muestra: _____	Fecha: ___/___/___ Hora: ___:___
Localización Sitio Muestra / Coordenadas:	X: _____
Nombre: _____	Y: _____
Tipo de Muestreo: _____	
Nombre del Recolector: _____	
Naturaleza del Pre-tratamiento: _____	
Preservante o Estabilizador adicionado: _____	
Condiciones Atmosféricas: _____	
Presencia de Anfibios: _____	
Observaciones: _____	

Anexo 5: Resultados Análisis Físico Químicos

ID	Fecha	Hora	Responsable	pH	Temperatura °C	Conductividad µS/cm	OD mg/l	OD %	Nitritos mg/l	Nitratos mg/l
CM1										
TOM1	24/11/2016	9:33	Paúl León Lorena Abad	7,61	16,8	287	2,37	32,6	0,105	0,8
TOM2	24/11/2016	9:48	Paúl León Lorena Abad	8,34	18,1	244	6,62	98,1	0,012	0,4
YAN1	24/11/2016	8:40	Paúl León Lorena Abad	7,59	15,2	242	2,19	29,3	0,002	0,3
YAN2	24/11/2016	8:15	Paúl León Lorena Abad	7,87	16,8	238	4,99	69,5	0,006	0,6
YAN3	24/11/2016	9:09	Paúl León Lorena Abad	8,64	16,9	212	6,57	92,4	0,009	0,5
PAR1	25/11/2016	8:19	Paúl León Lorena Abad	7,92	15,7	299	4,78	64,6	0,001	0,5
PAR2	25/11/2016	8:34	Paúl León Lorena Abad	7,39	13,8	220	1,2	15,4	IND	IND
TAR1	25/11/2016	9:27	Paúl León Lorena Abad	7,66	15,8	235	2,42	32,9	0,007	0,4
TAR2	25/11/2016	9:10	Paúl León Lorena Abad	7,79	17,2	277	3,26	45	0,015	0,2
TAR3	25/11/2016	9:45	Paúl León Lorena Abad	7,45	15,1	214,2	0,52	6,9	0,005	0,1
CM2										



TOM1	29/11/2016	9:24	Paúl León Lorena Abad	7,59	16,3	300	2,1	28,9	IND	IND
TOM2	29/11/2016	9:40	Paúl León Lorena Abad	8,68	17,8	241	6,23	90,7	0,003	0,5
YAN1	29/11/2016	8:36	Paúl León Lorena Abad	7,45	15,8	195	1,43	19,4	IND	IND
YAN2	29/11/2016	8:11	Paúl León Lorena Abad	7,47	17,4	186,9	2,28	32,3	0,003	0,4
YAN3	29/11/2016	9:03	Paúl León Lorena Abad	7,94	17,2	207,5	4,95	69,3	0,001	0,8
PAR1	30/11/2016	8:20	Paúl León Lorena Abad	8,16	16,6	285	4,88	68	0,001	0,5
PAR2	30/11/2016	8:35	Paúl León Lorena Abad	7,52	14,4	203,6	0,8	10,6	IND	IND
TAR1	30/11/2016	9:49	Paúl León Lorena Abad	8,58	15,8	281	3,68	51,1	0,003	0,2
TAR2	30/11/2016	9:10	Paúl León Lorena Abad	7,75	17,1	293	3,71	52,9	0,002	0,7
TAR3	30/11/2016	9:30	Paúl León Lorena Abad	8,58	15,7	265	0,62	8,5	IND	0,1
CM3										
TOM1	6/12/2016	9:11	Paúl León Lorena Abad	7,68	15,9	340	2,94	41	0,000	0,7
TOM2	6/12/2016	9:26	Paúl León Lorena Abad	7,88	17,8	264	3,81	55,2	0,000	1,3
YAN1	6/12/2016	8:29	Paúl León Lorena Abad	7,78	15,4	214,2	1,21	16,4	0,000	0,7
YAN2	6/12/2016	8:11	Paúl León Lorena Abad	7,56	17,6	221	3,12	44,3	0,003	0,7
YAN3	6/12/2016	8:50	Paúl León Lorena Abad	8,13	16,9	224	5,59	78,6	0,003	0,8
PAR1	8/12/2016	8:24	Paúl León Lorena Abad	7,82	17,9	301	3,04	43,1	0,002	0,8
ID	Fecha	Hora	Responsable	pH	Temperatura °C	Conductividad µS/cm	OD mg/l	OD %	Nitritos mg/l	Nitratos mg/l
PAR2	8/12/2016	8:39	Paúl León Lorena Abad	7,45	15,3	224	0,83	11,2	IND	IND
TAR1	8/12/2016	9:55	Paúl León Lorena Abad	7,63	15,9	334	2,46	33,9	0,000	0,4
TAR2	8/12/2016	9:17	Paúl León Lorena Abad	7,79	17,7	319	1,73	24,9	0,001	0,9
TAR3	8/12/2016	9:32	Paúl León Lorena Abad	7,45	15,7	311	0,18	2,5	IND	IND
CM4										
TOM1	14/12/2016	9:18	Paúl León Lorena Abad	7,61	15,3	370	2,58	35,9	0,000	0,7
TOM2	14/12/2016	9:33	Paúl León Lorena Abad	7,72	17,3	309	2,39	18,0	0,004	0,6
YAN1	14/12/2016	8:34	Paúl León Lorena Abad	8,84	14,8	230	1,28	17,2	IND	1,1
YAN2	14/12/2016	8:11	Paúl León Lorena Abad	7,46	17,4	214	3,00	42,3	0,003	0,7
YAN3	14/12/2016	8:57	Paúl León Lorena Abad	8,04	16,6	233	4,13	57,4	0,002	1,0
PAR1	15/12/2016	8:23	Paúl León Lorena Abad	7,73	17,6	284	2,83	39,7	0,003	1
PAR2	15/12/2016	8:40	Paúl León Lorena Abad	7,43	14,7	232	1,15	15,2	IND	6,7
TAR1	15/12/2016	9:52	Paúl León	7,91	16,2	315	3,69	51	0,003	0,8



			Lorena Abad								
TAR2	15/12/2016	9:20	Paúl León Lorena Abad	7,63	17,3	316	3,34	47,2	0,003	0,6	
TAR3	15/12/2016	9:35	Paúl León Lorena Abad	7,73	15,7	316	0,98	13,4	IND	0	
CM5											
PAR1	20/12/2016	8:21	Paúl León Lorena Abad	7,68	16,6	207,5	2,63	36,3	0,004	0,6	
PAR2	20/12/2016	8:32	Paúl León Lorena Abad	7,32	14,5	207,4	1,01	13,2	IND	IND	
TAR1	20/12/2016	9:28	Paúl León Lorena Abad	8,53	15,6	305	3,37	45,8	0,001	0,8	
TAR2	20/12/2016	9:03	Paúl León Lorena Abad	7,64	16,7	310	2,31	32,1	0,001	0,8	
TAR3	20/12/2016	9:14	Paúl León Lorena Abad	7,59	15	315	1,23	16,7	0	0,4	
TOM1	20/12/2016	10:47	Paúl León Lorena Abad	7,58	16,8	328	1,91	26,8	0,003	1,5	
TOM2	20/12/2016	11:02	Paúl León Lorena Abad	7,85	20,6	280	4,32	67,8	0,002	1,2	
YAN1	20/12/2016	10:03	Paúl León Lorena Abad	7,75	16,1	230	1,89	25,9	0,006	0,8	
YAN2	20/12/2016	9:48	Paúl León Lorena Abad	7,59	17,6	216	3,56	50,4	0,003	1	
YAN3	20/12/2016	10:27	Paúl León Lorena Abad	7,97	17,9	224	4,63	65,4	0,005	0,9	
CM6											
PAR1	30/12/2016	8:17	Paúl León Lorena Abad	7,8	18	241	3,76	53,6	NA	NA	
PAR2	30/12/2016	8:35	Paúl León Lorena Abad	7,42	15,4	216,8	1,5	20,2	NA	NA	
TAR1	30/12/2016	10:33	Paúl León Lorena Abad	7,91	18,4	303	4,87	71,2	NA	NA	
ID	Fecha	Hora	Responsable	pH	Temperatura °C	Conductividad µS/cm	OD mg/l	OD %	Nitritos mg/l	Nitratos mg/l	
TAR2	30/12/2016	10:05	Paúl León Lorena Abad	7,99	19,3	289	6,7	99,6	NA	NA	
TAR3	30/12/2016	10:18	Paúl León Lorena Abad	7,69	17,4	312	3,11	44,2	NA	NA	
TOM1	30/12/2016	11:04	Paúl León Lorena Abad	7,61	17,8	343	3,32	48	NA	NA	
TOM2	30/12/2016	11:18	Paúl León Lorena Abad	7,91	20,8	295	5,08	77,6	NA	NA	
YAN1	30/12/2016	9:06	Paúl León Lorena Abad	7,6	16,4	246	2,35	32,5	NA	NA	
YAN2	30/12/2016	9:46	Paúl León Lorena Abad	7,67	19	232	5,05	74,5	NA	NA	
YAN3	30/12/2016	9:28	Paúl León Lorena Abad	7,89	18,4	222	4,7	67,8	NA	NA	
CM7											
PAR1	4/1/2017	9:01	Paúl León Lorena Abad	7,92	17,1	243	4	55,0	0,001	0,7	
PAR2	4/1/2017	9:14	Paúl León Lorena Abad	7,45	19,2	222	0,72	9,9	IND	IND	
TAR1	4/1/2017	10:36	Paúl León Lorena Abad	7,71	19,6	270	4,92	67,7	0,002	1,7	
TAR2	4/1/2017	10:11	Paúl León Lorena Abad	9,04	20,9	270	4,88	67,1	0,01	1,4	
TAR3	4/1/2017	10:25	Paúl León	8,48	18,9	292	1,96	27,0	0,01	1,2	

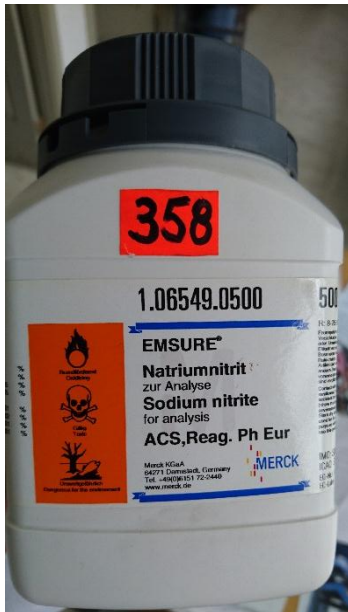


			Lorena Abad							
TOM1	4/1/2017	11:16	Paúl León Lorena Abad	8,11	20	366	1,13	15,5	0,003	1,1
TOM2	4/1/2017	11:26	Paúl León Lorena Abad	7,99	20,4	296	4,67	64,2	0,003	1,4
YAN1	4/1/2017	9:51	Paúl León Lorena Abad	7,61	18,2	250	0,88	12,1	0,002	1,9
YAN2	4/1/2017	9:41	Paúl León Lorena Abad	7,74	19,7	237	4,37	60,1	0,003	1,8
YAN3	4/1/2017	10:52	Paúl León Lorena Abad	7,86	19,7	225	4,1	56,4	0,002	1,4
CM8										
PAR1	10/1/2017	8:18	Paúl León Lorena Abad	7,68	17,6	252	3,83	53,7	0,001	0,1
PAR2	10/1/2017	8:30	Paúl León Lorena Abad	7,5	15,4	237	0,77	10,3	IND	IND
TAR1	10/1/2017	9:44	Paúl León Lorena Abad	7,97	17	262	6,34	88	0	0,5
TAR2	10/1/2017	9:24	Paúl León Lorena Abad	7,78	17,5	276	3,63	51,2	0,002	0,3
TAR3	10/1/2017	9:33	Paúl León Lorena Abad	7,69	16,2	305	0,9	12,4	IND	IND
TOM1	10/1/2017	10:18	Paúl León Lorena Abad	7,11	16,6	349	1,38	18,9	0,001	0
TOM2	10/1/2017	10:28	Paúl León Lorena Abad	8,02	18,7	272	4,71	68,4	0,004	0,5
YAN1	10/1/2017	8:56	Paúl León Lorena Abad	8,51	16	256	0,91	12,4	0,004	0,8
YAN2	10/1/2017	9:13	Paúl León Lorena Abad	7,68	17,5	238	3,83	53,8	0,002	0,9
YAN3	10/1/2017	10:02	Paúl León Lorena Abad	7,89	17,6	225	3,65	51,5	0,003	0,8
CM9										
ID	Fecha	Hora	Responsable	pH	Temperatura °C	Conductividad µS/cm	OD mg/l	OD %	Nitritos mg/l	Nitratos mg/l
PAR1	19/1/2017	10:13	Lorena Abad	9,14	16,2	215	4,88	69,1	0,004	0,0
PAR2	19/1/2017	10:24	Lorena Abad	7,72	15,2	244	0,9	12	IND	IND
TAR1	19/1/2017	9:37	Lorena Abad	7,67	15,2	275	1,05	14	0,001	0,4
TAR2	19/1/2017	9:25	Lorena Abad	7,88	15,7	260	3,04	41	0,003	0,4
TAR3	19/1/2017	9:10	Lorena Abad	7,67	14	303	0,76	9,9	IND	IND
TOM1	19/1/2017	10:52	Lorena Abad	7,62	14,8	319	0,26	3,4	0,001	0,2
TOM2	19/1/2017	11:05	Lorena Abad	8,12	18,8	264	5,14	74,9	0,004	0,5
YAN1	19/1/2017	8:37	Lorena Abad	7,82	14,6	248	1,72	22,7	0,005	0,5
YAN2	19/1/2017	8:53	Lorena Abad	7,75	16,4	262	2,8	38,4	0,004	0,6
YAN3	19/1/2017	8:15	Lorena Abad	7,93	16,1	213,6	3,73	50,3	0,005	0,7
CM10										
PAR1	26/1/2017	8:22	Paúl León Lorena Abad	8,33	15,5	227	5,89	78,7	0,009	0,8
PAR2	26/1/2017	8:31	Paúl León Lorena Abad	7,64	14,1	240	0,73	9,4	IND	IND
TAR1	26/1/2017	9:52	Paúl León Lorena Abad	8,02	15,6	287	5,69	76,7	0,002	0,6
TAR2	26/1/2017	9:34	Paúl León Lorena Abad	8,12	15,7	274	2,34	31,7	0,002	0,6
TAR3	26/1/2017	9:26	Paúl León Lorena Abad	7,73	14,6	378	0,62	8,2	IND	IND
TOM1	26/1/2017	10:26	Paúl León Lorena Abad	7,78	15,2	345	1,04	13,8	IND	0,9
TOM2	26/1/2017	10:36	Paúl León	8,32	17,2	266	2,71	37,9	0,006	1,9



			Lorena Abad							
YAN1	26/1/2017	9:08	Paúl León Lorena Abad	7,8	15,1	232	1,48	19,6	0,006	0,9
YAN2	26/1/2017	8:57	Paúl León Lorena Abad	7,69	16	253	2,73	37,2	0,003	0,7
YAN3	26/1/2017	10:09	Paúl León Lorena Abad	7,98	16,2	233	4,49	61,4	IND	1,1
CM11										
PAR1	31/1/2017	8:15	Paúl León Lorena Abad	9,33	15,6	215,4	7,04	94,2	0,000	0,6
PAR2	31/1/2017	8:30	Paúl León Lorena Abad	7,73	14,5	247	0,89	11,6	IND	IND
TAR1	31/1/2017	9:50	Paúl León Lorena Abad	8,04	17,6	282	6,5	91,8	0,003	0,4
TAR2	31/1/2017	9:35	Paúl León Lorena Abad	7,97	16	274	0,34	4,6	0,006	0,5
TAR3	31/1/2017	9:26	Paúl León Lorena Abad	7,81	15,2	337	0,88	11,7	IND	0,2
TOM1	31/1/2017	10:50	Paúl León Lorena Abad	7,76	16,6	355	4,81	66,9	0,003	0,3
TOM2	31/1/2017	10:39	Paúl León Lorena Abad	7,69	17,1	252	7,69	108	IND	0,5
YAN1	31/1/2017	8:59	Paúl León Lorena Abad	7,81	14,9	236	1,34	17,6	0,001	0,6
YAN2	31/1/2017	9:13	Paúl León Lorena Abad	7,74	16	260	3,17	43,2	0,001	0,7
YAN3	31/1/2017	10:10	Paúl León Lorena Abad	7,95	16	236	4,88	66,5	0,002	0,6
CM12										
PAR1	2/2/2017	8:30	Paúl León Lorena Abad	8,86	17,1	215,6	6,07	84	0,008	0,9
PAR2	2/2/2017	8:40	Paúl León Lorena Abad	7,69	15,1	251	0,99	13	IND	IND
ID	Fecha	Hora	Responsable	pH	Temperatura °C	Conductividad µS/cm	OD mg/l	OD %	Nitritos mg/l	Nitratos mg/l
TAR1	2/2/2017	10:05	Paúl León Lorena Abad	8,04	16,4	298	6,45	88,8	0,016	0,8
TAR2	2/2/2017	9:52	Paúl León Lorena Abad	7,88	16,5	284	3,13	43	0,007	0,6
TAR3	2/2/2017	9:42	Paúl León Lorena Abad	7,79	15,7	345	0,6	8	0,007	0
TOM1	2/2/2017	10:42	Paúl León Lorena Abad	7,61	16,4	361	2,13	28,7	0,005	0,5
TOM2	2/2/2017	10:55	Paúl León Lorena Abad	8,54	19,6	245	7,02	102,2	0,006	0,6
YAN1	2/2/2017	9:12	Paúl León Lorena Abad	7,81	15,8	243	2,46	33,2	0,013	0,3
YAN2	2/2/2017	9:25	Paúl León Lorena Abad	7,67	16,9	264	3,17	44,6	0,006	1,1
YAN3	2/2/2017	10:23	Paúl León Lorena Abad	7,96	17,3	237	7,56	105,8	0,005	0,5

Anexo 6: Bioensayo Toxicológico



Reactivo Nitrito de Sodio utilizado en el bioensayo



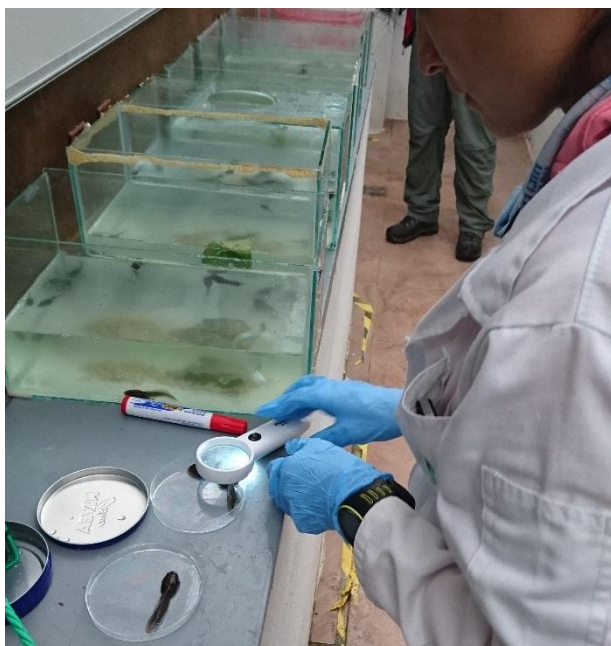
Terrario con las larvas presentes



Primer día de la realización del bioensayo



Observación macroscópica de larva muerta



Análisis de los especímenes



Observación previa a la necropsia



Vista general de los terrarios



Vista detallada de los terrarios