

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀) Y EFECTO HISTOPATOLÓGICO DEL PERMANGANATO DE POTASIO, EN RENACUAJOS DE RANA TORO *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae)

Sima-Álvarez, R. rsima@kin.cieamer.conacyt.mx,
Mejía-Muñoz, M., Rodríguez-Serna, M. y Güemez-Ricalde, J.
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN,
Unidad Mérida, Yucatán, México

Artículo recibido: 15 de agosto de 2001

Artículo aceptado: 29 de noviembre de 2001

RESUMEN

El permanganato de potasio es utilizado como un biocida en cultivos intensivos. Para conocer un poco más su efecto, se llevó a cabo un estudio con renacuajos de la especie *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) con el objetivo de conocer la concentración letal media de permanganato de potasio, así como sus efectos histopatológicos. Un total de 240 renacuajos fueron expuestos a siete diferentes concentraciones de permanganato en un rango que varió de 0.4 a 3.0 mg/l durante 96 horas. No se observó mortalidad en concentraciones de 0.4 y 0.8 mg/l, mientras que el máximo de mortalidad tuvo lugar al final de las primeras siete horas en concentraciones de 2.3, 2.7 y 3.0 mg/l. La concentración letal fue de 1.22 mg/l al final de todo el experimento. El permanganato de potasio afectó el tejido epitelial a nivel de la epidermis, causando necrosis e hipertrofia de las células epiteliales y presencia de mucosidad.

Palabras clave: Renacuajos, *Rana catesbeiana*, permanganato de potasio, histología

ABSTRACT

The potassium permanganate is used as a biocide in aquatic intensive cultures. Therefore, an experiment was carried out with tadpoles of *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) in order to determine the lethal mean concentration of potassium permanganate as well as its histopathological effect. A total of 240 tadpoles were exposed to seven different permanganate concentrations ranging from 0.4 to 3.0 mg/l during 96 hours. No mortality was found at concentrations of 0.4 and 0.8 mg/l while the maximum deaths took place at the end of the first seven hours in concentrations of 2.3, 2.7 and 3.0. Lethal concentration was 1.22 mg/l at the end of the whole experiment. Permanganate affected the tissues at epithelial level such as epidermis destruction, epithelial cells hypertrophy and mucus cells.

Keywords: Tadpoles, *Rana catesbeiana*, potassium permanganate, histology

INTRODUCCIÓN

El cultivo intensivo de la rana ha traído consigo el desarrollo de enfermedades que han afectado a las granjas ranícolas, debido a que han ocasionado pérdidas económicas por las altas mortalidades causadas por la presencia de bacterias como las *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Glorioso *et al.*, 1974, 1974a; Pearson *et al.*, 1996; Crumlish y Inglis, 1995, 1999). Sin embargo, en la búsqueda de tratamientos contra organismos patógenos se han realizado estudios sobre los efectos de diferentes biocidas en algunas especies de anfibios de importancia comercial (Diechman y Mergara,

1948; Fisher y Shelser, 1976; Mc Crarent y Phillips, 1977).

Desafortunadamente, gran parte de las sustancias químicas utilizadas de manera terapéutica, se utilizan empíricamente y esto tiene como resultado una alta mortalidad causada por una sobre exposición de los animales a dosis excesivas del biocida, debido al grado de toxicidad del compuesto y a la especie sujeta a tratamiento (Armstrong y Sloon, 1980). Es por ello que debe conocerse la concentración adecuada de los agentes quimioterapéuticos que se aplican como tratamiento contra ectoparásitos, bacterias y hongos (Wooton *et al.*, 1993; Pearson, 1996a). Asimismo la profilaxis y los

métodos preventivos relacionados con el manejo de los organismos y la calidad del agua, juegan un papel importante para el control de enfermedades en cultivos intensivos (Adams y Bruinsma, 1987; Cerino, 1992; Rodríguez *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 1996).

Sin embargo, la mayoría de los estudios que se han realizado con sustancias quimioterapéuticas para el control de ectoparásitos en organismos acuáticos, se han practicado en peces cultivados en sistemas intensivos (Mendoza, 1985; Cerino, 1992), dicha información no siempre puede ser inferida o aplicable a todo tipo de organismos como es el caso de los renacuajos, en donde la información es escasa (Rodríguez *et al.*, 1998).

Una de las sustancias químicas utilizadas como antiséptico desde 1904 es el permanganato de potasio. Esta sustancia es un agente oxidante, útil para neutralizar diversos alcaloides. En la acuicultura se utiliza para tratamientos contra lesiones externas y ectoparásitos como bacterias, hongos y protozoarios, con resultados excelentes ya que éstos pueden dar origen a infecciones secundarias (Chun, 1976; Reichenbach, 1976; Herwig, 1979; Conroy, *et al.*, 1982).

Al parecer, esta sustancia no reacciona de igual manera en todos los organismos, por lo que cada especie tiene sus límites de tolerancia, dependiendo de su fisiología y condiciones ambientales. Ya que una de las propiedades terapéuticas del permanganato de potasio es la liberación de oxígeno y la formación de dióxido de manganeso, el oxígeno liberado es el que origina daño en el organismo, ocasionando alteraciones a órganos vitales (Kabata, 1985). Este estudio se realizó para conocer la concentración letal media (CL₅₀) y el efecto histológico del permanganato de potasio en renacuajos de la rana toro *Rana catesbeiana* (Shaw, 1810) con la finalidad de utilizar esta sustancia de manera profiláctica en cultivos intensivos de renacuajos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los organismos

Para la realización de este trabajo se utilizaron renacuajos de un solo desove de

Rana catesbeiana, cultivadas en el laboratorio de acuicultura del Departamento de Recursos del Mar en el CINVESTAV - Mérida. Antes del experimento, las crías se mantuvieron aisladas por una semana como un medio preventivo para que los renacuajos, en estadio 22 (Gosner, 1960), se aclimataran y así disminuir el grado de estrés en los animales.

Diseño experimental

Con el fin de conocer las concentraciones a utilizar en el experimento, se realizó un bioensayo preliminar, incrementando gradualmente las concentraciones en porción geométrica, estableciendo un intervalo de concentraciones relativamente grandes (Diechman y Mergara, 1948). De acuerdo con el ensayo preliminar se ajustaron las concentraciones a la dosis mínima efectiva y máxima de tolerancia aparente. El rango resultante hizo posible la determinación de los intervalos en los cuales se presentó la mortalidad.

Para la realización del experimento se utilizaron un total de 240 renacuajos para 7 concentraciones (0.4, 0.8, 1.4, 2.0, 2.3, 2.7 y 3.0 mg/l) y un control. El peso promedio de los animales fue de 0.25±1 g y una longitud promedio de 2.75±1 cm. El agente de estudio (KMnO₄) fue disuelto directamente en el agua. El experimento se realizó bajo condiciones de laboratorio donde se controló la temperatura a 20° ± 1° C y se mantuvo un fotoperiodo de 12 horas día y 12 horas oscuridad. Durante todo el experimento se registraron las variaciones del oxígeno, temperatura y pH.

Se utilizó un sistema estático equipado con entrada de oxígeno constante, el cual consistió de 24 frascos experimentales con capacidad de 1 litro cada uno. Una vez iniciado el experimento se hicieron las observaciones cada hora durante las primeras 24 horas, posteriormente cada doce horas hasta completar las noventa y seis horas, al término de este tiempo se dio por concluida esta fase del experimento.

Análisis estadístico

Las concentraciones letal y subletal durante los diferentes tiempos de exposición se determinaron mediante un análisis Probit (Vizcarra, 1986; Kalish, 1990) y una

regresión lineal simple (Zar, 1974). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el paquete de *Statistica for Windows*, versión 4.3 (StatSoft Inc., 1993).

Proceso histológico

Los organismos fueron fijados en una solución de formol al 10% tamponado con fosfatos de sodio, se fijaron organismos recién muertos en las diferentes concentraciones que se utilizaron, los cortes se realizaron con la ayuda de un micrótopo rotatorio de marca Leitz, a un grosor de 5 m, posteriormente se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina, los cortes fueron conservados de manera permanente utilizando una resina de bálsamo de Canadá (Roberts, 1989).

RESULTADOS

Los datos de mortalidad para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) se observan en la Tabla 1, en ésta se observa que no hubo mortalidad de renacuajos expuestos a las primeras concentraciones de 0.4 y 0.8 mg/l durante las 96 horas que duró el experimento.

Tiempo (h)	Concentración (KMnO ₄ mg/l)						
	0.4	0.8	1.4	2.0	2.3	2.7	3.0
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	40	57	73
3	0	0	0	50	77	100	100
4	0	0	27	93	93	100	100
5	0	0	43	93	93	100	100
6	0	0	73	93	93	100	100
7	0	0	73	93	100	100	100
8	0	0	73	93	100	100	100
9	0	0	73	93	100	100	100
10	0	0	73	93	100	100	100
11	0	0	73	93	100	100	100
12	0	0	73	93	100	100	100
24	0	0	73	93	100	100	100
36	0	0	73	93	100	100	100
48	0	0	73	93	100	100	100
60	0	0	73	93	100	100	100
72	0	0	73	93	100	100	100
96	0	0	73	93	100	100	100

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de renacuajos de la *Rana catesbeiana* sometidos a diferentes concentraciones de permanganato de potasio durante 96 horas.

Los máximos valores en los porcentajes de mortalidad se observaron al final de las primeras 7 horas para cada una de las concentraciones a excepción de las dos primeras. Las concentraciones en las cuales se determinó la concentración letal media se observan en la Tabla 2 y gráficamente en la Figura 1. Se distinguen las concentraciones letales en las primeras 7 horas.

Los parámetros fisicoquímicos registraron en promedio oxígeno a saturación

Tiempo (h)	CL ₅₀ (KMnO ₄ mg/l)	Límite de confianza 95%	
		Inferior	Superior
1	-	-	-
2	2.55	2.42	2.68
3	2.00	1.90	2.10
4	1.62	1.53	1.70
5	1.48	1.40	1.55
6	1.22	1.15	1.28

Tabla 2. Concentración letal media (CL₅₀) con permanganato de potasio en renacuajos de *Rana catesbeiana*, durante 96 horas.

y temperatura constante (Tabla 3) durante todo el experimento. El pH presentó una mayor basicidad en los tratamientos que en el control a partir de las 8 h a las 36 h (Tabla 3a), esto se debe a que el permanganato de potasio reacciona con el agua manteniéndola alcalina. Sin embargo, se presentó una ligera caída de este parámetro, que se observó tanto en el control como en los tratamientos durante el experimento, esto es debido a la presencia de materia orgánica resultado de los desechos de los organismos, lo cual trae como consecuencia una disminución del efecto tóxico del permanganato (Marking, 1969). Sin embargo, los resultados obtenidos en los parámetros fisicoquímicos se presentan dentro de los rangos aceptables de acuerdo a lo reportado por Balarin (1979) para organismos acuáticos.

Parámetro	Promedio	E. S.
Temperatura (°C)	20.7	1
Oxígeno (mg/l)	7.4	1

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos del agua durante el experimento.

Tiempo (h)	Control	Tratamientos	E. S.
Inicial	9.1	9.1	1.5
4	8.9	8.9	1.5
8	8.6	8.7	1.5
12	8	8.5	1.4
24	8	8.5	1.5
36	8	8.4	1.6
48	8	8	1
96	8	8	1

Tabla 3a. Determinación del pH.

A nivel histológico se observó que los renacuajos mantenidos en la solución control no presentaron daños a nivel del epitelio como se muestra en la Figura 2, mientras que los renacuajos que se expusieron a diferentes concentraciones de permanganato de potasio presentaron daños a nivel del epitelio, este daño histológico de la epidermis se vio incrementado conforme la concentración de la sustancia química fue

mayor, en este sentido se observó que en la concentración de 1.4 mg/l las células epiteliales se ven ligeramente destruidas. En la concentración de 2.0 mg/l el daño que presenta la epidermis es mayor, ya que se observa una hipertrofia de las células epiteliales con presencia de ligera mucosidad y el epitelio de los renacuajos que permanecieron en las concentraciones 2.3 mg/l mostraron una hipertrofia de las células epiteliales de la epidermis, así como una destrucción de la epidermis de manera multifocal con presencia de alta cantidad de mucosidad (Figura 3).

Con respecto a otros tejidos como el hígado, riñón, corazón, no se observó una respuesta hacia la sustancia química utilizada.

DISCUSIÓN

El éxito de los tratamientos quimioterapéuticos en organismos acuáticos

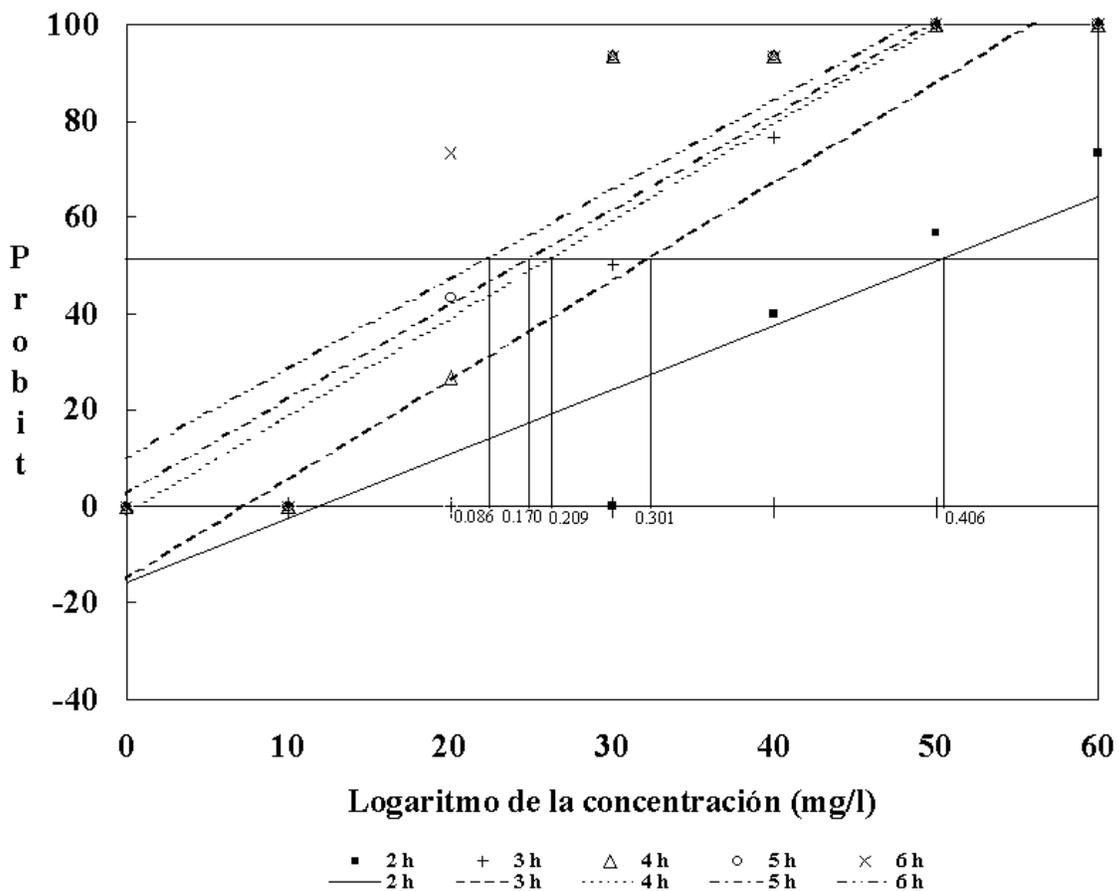


Figura 1. Gráfica en la que se observa la LC₅₀ con el análisis de Probit de cinco concentraciones.



Figura 2. Corte histológico de la epidermis de renacuajos de *Rana catesbeiana* expuestos a la solución control (H & E, 250 x)



Figura 3. Corte histológico en la que se observa hipertrofia de las células epiteliales y necrosis de la epidermis en renacuajos de *Rana catesbeiana* expuestos a la solución de permanganato de potasio (H & E, 250x).

(peces, moluscos, crustáceos y anfibios) sometidos a cultivo, radica en el mejor de los casos, con la erradicación o disminución de un problema parasitario que ocasiona un daño severo en sus hospederos. Aunque es muy limitada la información sobre toxicidad y sus efectos en el tejido de los anfibios, la tendencia de los pocos resultados al respecto, sugiere que la rana toro *R. catesbeiana* puede ser altamente susceptible

a sustancias extrañas (como es el caso de metales u otros agentes antropogénicos) cuando están presentes en su ambiente. En comparación con los peces, las ranas parecen exponerse al medio acuático de una forma muy directa, lo cual puede explicarse por sus diferencias anatómicas externas que presentan y por su funcionamiento fisiológico, ya que los renacuajos utilizan la piel como parte

importante para su respiración (Meglitsch, 1967; Duellman y Trueb, 1986; Villet, 1992).

De acuerdo con la mortalidad obtenida, los renacuajos presentaron poca resistencia al permanganato de potasio en altas concentraciones. Sin embargo, algunos de los organismos en la concentración de 2.0 mg/l sobrevivieron a pesar de que el permanganato de potasio tuvo una acción cáustica sobre ellos, causándoles daño epitelial que se evidenció con el desprendimiento de la piel. También se observó que la CL_{50} está directamente relacionada al tiempo, ya que la mayor mortalidad se registró durante las primeras horas de exposición al reactivo, esto es debido a que el reactivo se inactiva con el paso del tiempo. Los renacuajos que resistieron al tóxico aparentemente se recuperaron por el comportamiento que presentaron, sin embargo, la piel todavía se observó dañada. Dichos organismos al final del experimento revelaron a nivel de tejido (epidermis) un daño de carácter irreversible.

El efecto negativo del permanganato de potasio es similar a lo observado en peces en donde el daño ocurre a nivel externo y con características de tipo irreversible (Prieto *et al.*, 1986).

El efecto negativo del permanganato de potasio en organismos acuáticos ha sido atribuible a los factores fisicoquímicos del medio acuático, como son el pH y la temperatura como determinantes de la efectividad y toxicidad del compuesto; en este sentido el efecto tóxico del compuesto puede verse favorecido en condiciones de pH menores a 6 y a temperaturas altas (Prieto, 1987). En este trabajo no es posible asumir que el pH y la temperatura hayan favorecido el potencial tóxico del permanganato de potasio en los renacuajos de la rana toro. La ligera variación alcalina del pH en las concentraciones contra el control no justifica en gran medida el efecto tóxico observado con el permanganato de potasio en los renacuajos. La presencia del agente quimioterapéutico y de la materia orgánica en el medio acuático durante el experimento pudo generar esa ligera diferencia.

El efecto del agente quimioterapéutico tiende a reflejarse en el tiempo de vida media del mismo, esto puede observarse en parte

en el permanganato de potasio por los cambios de coloración que adquiere, generalmente para el éxito en la eliminación de ectoparásitos, en peces, la opción más confiable son baños cortos (Amlacher y Herman, 1970; Herwig, 1979; Prieto, 1987).

En este trabajo nuestro objetivo no pretendía un seguimiento tal para valorar la Dosis Efectiva media (DE_{50}) en *R. catesbeiana* y sí valorar el tiempo final del cese de movimiento del organismo (muerte); sin embargo, fue posible tomar como información preliminar y valiosa para estudios posteriores la distinción de tres fases del comportamiento de los animales:

- La primera fase se caracterizó por un estado de estrés en el renacuajo desde el momento de estar en contacto con el tóxico (movimientos continuos en todas las paredes del recipiente).
- La segunda fase nos permitió observar al renacuajo en un estado de completo daño a nivel de epidermis (erosión de la piel) y con movimientos menos continuos.
- En la tercera fase el renacuajo comenzó a tener movimientos letárgicos pasando por una fase de agonía, hasta llegar a la muerte.

El conocimiento acerca del comportamiento de los renacuajos de la *R. catesbeiana* con el tóxico es nulo, por lo que estos diferentes estados que presentaron los renacuajos antes de morir son importantes debido a que en un momento dado nos pueden dar información de cuándo un organismo de este tipo puede ser afectado por una sustancia tóxica, como se ha observado en trabajos similares realizados con otras especies en las cuales los organismos presentan diferentes respuestas al tóxico antes de morir (Cerino, 1992).

CONCLUSIONES

En concentraciones de 0.8 mg/l de $KMnO_4$ o menores los renacuajos pueden sobrevivir por un largo periodo (más de 96 horas).

En concentraciones de 2 mg/l de KMnO₄ o mayores los renacuajos no sobreviven después de siete horas.

A nivel de epidermis los renacuajos son afectados a cualquier concentración.

El reactivo KMnO₄ cambia a un color amarillento cuando pierde su efecto tóxico, debido a la presencia de materia orgánica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al M. en C. Edgar Mendoza Franco por sus comentarios y sugerencias al artículo, así también al Técnico Gregory Arjona Torres por su ayuda en la preparación de los cortes histológicos en el laboratorio de Patología Acuática del CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida.

LITERATURA CITADA

- ADAMS, I. K. and M. D. BRUINSMA, 1987. Intensive commercial bullfrog culture: A Brazilian experience. *Aquaculture magazine*, 13 (4): 28-44.
- AMLACHER, D. A. and R. L. HERMAN, 1970. Textbook of fish diseases. Neptune, New Jersey, T.F.H. Publications, inc. 311 pp.
- AMSTRONG, R. W. and J. SLOON, R. J., 1980. Measurement of pollutant toxicity to fish: (1) bioassay methods for acute toxicity. *Water Res. Board of Can.* 3: 793-821.
- BALARIN, J. D., 1979. Tilapia, a guide to their biology and culture in Africa. University of Stirling Scotland, 76 pp.
- CERINO, R. M., 1992. Dosis letal media (DL₅₀) de formalina para el tratamiento de trichonidiasis en crías de *Cichlasoma urophthalmus* en condiciones de cultivo. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán. 45 pp.
- CHUN, S. K., 1976. The stress of drug treatment to common carp, *Cyprinus carpio*. *Bull. Korean Fis. Soc.*, 9(4): 205-271.
- CONROY, D. A., J. MORALES, C. PERDOMO, R. A. RUIZ and J. A. SANTACANA, 1982. The prevention and control of diseased conditions in South American ornamental fish. *RIV. ITAL. Piscic. Ictiopatul*, 17(3): 127-132.
- CRUMLISH, M. and V. INGLIS, 1995. Studies on susceptibility of farmed *Rana tigerena* and *Rana rugulosa* to frog septicemia disease and its control. *Aquaculture News* 20, 20-22.
- CRUMLISH, M. and V. INGLIS, 1999. Improved disease resistance in *Rana rugulosa* (Daudin) after -glucan administration. *Aquaculture Research* 30, 431-435.
- DIECHMAN, J. D. and D. MERGARA, 1948. Comparative evaluation of some methods used to express the degree of toxicity of a compound. *Journal aquatic toxicology*. 2: 157-164.
- DUELLMAN, W. E. and L. TRUEB, 1986. Biology of amphibians. Mc Graw-Hill Edt., New York. 557 pp.
- FISHER, W. S. and R. A. SHELSER, 1976. Toxicity of malaquite green to cultured American Lobsters larvae. *Aquatic toxicology*, 8: 151-156.
- FLORES-NAVA, A., D. VALDES-LOZANO and E. REAL-DE LEON, 1996. Water quality in bullfrog *Rana catesbeiana* tadpole rearing tanks and potential agricultural reuse of wastewater. En: The Annual Meeting of the World Aquaculture Society, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, January 29 - February 2.
- GLORIOSO, J. C., R. L. AMBORSKI, G. F. AMBORSKI and D.D. CULLEY, 1974. Microbiological studies on septicemic bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Amer. J. Vet. Res.* 35: 1241-1245.
- GLORIOSO, J.C., R. L. AMBORSKI, J. M. LARKIN, G. F. AMBORSKI and D. D. CULLEY, 1974a. Laboratory identification of bacterial pathogens of aquatic animals. *Amer. J. Vet. Res.* 35: 447-450.
- GOSNER, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetological*, 16: 183-190.
- HERWIG, N., 1979. Handbook of drugs and chemical used in the treatment of fish diseases. Charles C. Thomas Edt., Chicago, Illinois, U.S.A. 322 pp.
- KABATA, Z., 1985. Parasites and diseases of fish cultured in the tropics. Taylor & Francis Edt., 273 pp.
- KALISH, L. A., 1990. Efficient desing for stimation of median lethal dose and quantal dose-response curves. *Biometric* 46: 737-748.
- MARKING, L. L., 1969. Toxicological assays with fish. *Bull Wildlife Diseases Assoc.* 5: 194-291.

- McCRAREN, J. P. and T. R. PHILLIPS, 1977. Effects of masoten (Dylox) on plankton in earthen ponds. Proc. Annus. Conf. Assoc. Fish Wild. Agencies 31: 441-448.
- MEGLITSCH, P. A., 1967. Invertebrate zoology. Oxford University Press, New York, 750 pp.
- MENDOZA, P.M., 1985. Concentración letal de verde de malaquita en larvas de *Macrobrachium acanthurus*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán, 22 pp.
- PEARSON, M., 1996. Health and disease in laboratory housed tropical frogs. Aquaculture News, 21: 23-25.
- PEARSON, M.D., D. COLQUHOUN, T. SOMSIRI & V. INGLIS, 1996a. Biochemical characterization and rapid analysis of *Aeromonas* sp. isolated from septicemic *Rana rugulosa* (Weigmann) culture in Thailand. En: The Annual Meeting of the World Aquaculture Society, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, January 29-February 2.
- PRIETO, A., 1987. Monogéneos (Platyhelminthes) parásitos de peces de interés comercial sometidos a cultivos intensivos en Cuba; sistemática, patología y control. Tesis Doctoral, Universidad de La Habana, Cuba, 125 pp.
- PRIETO, A., E. FAJER, M. VINJOY and R. CARTAYA, 1986. Monogéneos parásitos de las especies de peces exóticas. Ciudad de La Habana, Boletín Técnico No. 22, 26 pp.
- REICHENBACH, K. H., 1976. Claves para el diagnóstico de las enfermedades de los peces. Acribia, Zaragoza, Edt., España, 220 pp.
- ROBERTS, R.J., 1989. Fish Pathology. Baillière Tindall Editors, 2nd edition, London, UK, 467 pp.
- RODRÍGUEZ-SERNA, M., R. SIMÁ-ÁLVAREZ, C. CARMONA-OSALDE and A. FLORES-NAVA, 1994. Efectos patológicos de la alta densidad en el cultivo de la rana toro *Rana catesbeiana* (Anuran: Ranidae). *Universidad y Ciencia*, 11 (21,22): 93-96 pp.
- RODRÍGUEZ, S. M., A. FLORES, M. A. OLVERA and C. CARMONA, 1996. Growth and production of bullfrog *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, at three stocking densities in a vertical intensive culture system. *Aquacultural engineering*, 15(4): 233:242.
- RODRÍGUEZ-SERNA, M., R. SIMÁ-ÁLVAREZ, C. CARMONA-OSALDE y C. REYES-SOSA, 1998. Determinación de la DL₅₀ de la sal común (NaCl) en renacuajos de *rana catesbeiana* (Shaw, 1810) (ANURAN:RANIDAE), como tratamiento profiláctico en la actividad ranícola. *Universidad y Ciencia*, 14 (26): 59-64
- VILLEE, C. A., 1992. Biología. Interamericana Editorial, 7a edición, 803 pp.
- VIZCARRA, Q.J., 1986. Dosis letal y subletal de triclorfon (Dipterex) en *Cichlasoma urophthalmus* (Cichlidae). Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico del Mar, Veracruz, 56 pp.
- WOOTON, D.M., K. A. RYAN, R. S. DEMAREE and R. L. CRITCHFIELD, 1993. A new species of *Gyrodactylus* (Monogenea :Monopisthocotylea) on tadpoles of *Rana catesbeiana* from California, U.S.A.. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 112(3): 230-233.
- ZAR, J. H., 1974. Biostatistical analysis. Prentice Hall Cliffs, N. J., 718 pp.