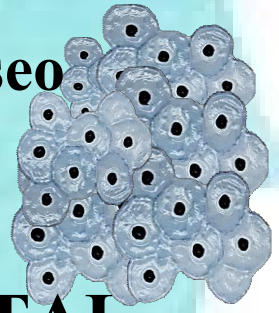


Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Tesis Doctoral 2020



**ESTUDIO DE CALIDAD AMBIENTAL
CON LARVAS DE ANFIBIOS COMO
BIOINDICADORES**



Lic. Sansiñena Jesica A.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

**Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias
Naturales**

2020

**“ESTUDIO DE CALIDAD AMBIENTAL CON LARVAS
DE ANFIBIOS COMO BIOINDICADORES”**

Lic. Sansiñena Jesica Alejandra

Directores: Dr. Natale Guillermo S. y Dr. Alcalde Leandro
Desarrollada con beca doctoral CONICET

A mis sobrinos y ahijado,
“Ningún soñador es demasiado
pequeño, ningún sueño es
demasiado grande.”

Mi pueblo

La Hermosa.

Bañada por el sol.

Coreada por el trino de tus aves.

Siguiendo tus calles voy.

Tus noches hermosas, ya no son.

Tu puente

Sus aguas, sin su antigua limpidez.

Tu camino blanco al anochecer...

Su sendero que pretendo seguir

Y quedo anonadado,

Sin comprender.

¿Qué pasa en mí?

¿Qué pasa en ti?

La civilización te ha alcanzado

Ya no hay mañana de paz

¡OH! si pudiera brindarte la paz que te quedo atrás.

Miguel Ángel Machado (27-9-1981)

ÍNDICE

RESUMEN-----1

ABSTRACT-----5

INTRODUCCIÓN GENERAL

Actividades antrópicas y degradación del ambiente-----9

Ecotoxicología-----11

Bioensayos-----12

Anfibios anuros como bioindicadores-----14

Ecotoxicología de anfibios----- 16

CAPÍTULO 1: ÁREA Y ESPECIES DE ESTUDIO

1.1. Introducción

1.1.1 Descripción de los recursos naturales de Argentina-----20

1.1.2 Actividades antrópicas-----20

1.1.3 Especies de estudio-----28

1.1.4 Inducción artificial de la reproducción-----31

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1 Selección de los sitios de muestreo-----32

1.2.2 Caracterización climática del periodo estudiado (2015-2018) -----32

1.2.3 Caracterización fisicoquímica del agua y sedimento-----33

1.2.4 Relevamiento de anfibios-----33

1.2.5 Inducción de la reproducción de *Boana pulchella*-----34

1.2.6 Análisis estadísticos-----36

1.3 Resultados

1.3.1 Descripción de los sitios -----37

1.3.2 Caracterización climática del periodo estudiado (2015-2018) -----47

1.3.3 Caracterización fisicoquímica del agua y sedimento
de los sitios de estudio-----48

1.3.4 Relevamiento de anfibios-----55

1.3.5 Inducción de la reproducción en <i>B. pulchella</i> -----	60
1.4 Discusión y Conclusión -----	61
CAPÍTULO 2: CARACTERES MORFOLÓGICOS	
LARVARIOS SENSIBLES A FACTORES DE ESTRÉS.	
2.1 Introducción	
2.1.1 Larvas de anuros como modelo de estudio-----	65
2.1.2 Descripción de la Anatomía larval normal-----	66
2.1.3 Descripción del desarrollo normal-----	67
2.1.4 Alteraciones en el desarrollo larval-----	73
2.2 Materiales y Métodos	
2.2.1 Colecta de huevos y mantenimiento en laboratorio-----	77
2.2.2 Descripción de larvas normales-----	77
2.2.3 Análisis de larvas anormales-----	78
2.2.4 Análisis de datos-----	80
2.3 Resultados	
2.3.1 Descripción de larvas normales-----	80
2.3.2 Análisis de larvas anormales-----	84
2.4 Discusión y Conclusión -----	91
CAPÍTULO 3: BIOENSAYOS CON SEDIMENTOS	
3.1 Introducción	
3.1.1 Composición y estructura de los sedimentos-----	96
3.1.2 Los sedimentos como destino final de los contaminantes-----	97
3.1.3 Bioensayos con sedimentos como herramienta bioanalítica-----	99
3.1.4 Bioensayos de sedimento con larvas de anuros-----	101
3.2 Materiales y Métodos	
3.2.1 Colecta de sedimentos-----	105
3.2.2 Organismos Prueba-----	105
3.2.3 Adecuación del protocolo para las especies de estudio. -----	106
3.2.4 Puntos Finales Evaluados-----	109

3.2.5 Control de la calidad del agua y sedimentos-----	109
3.2.6 Análisis estadístico asociado con los bioensayos-----	110

3.3 Resultados

3.3.1 Condiciones de ensayo-----	110
3.3.2 Bioensayos de toxicidad aguda con sedimento completo EG25-----	112
3.3.3 Bioensayos de toxicidad aguda con sedimentos empleando embriones (EG8) -----	120
3.3.4 Evaluación de la sensibilidad en diferentes etapas del desarrollo-----	126
3.3.5 Bioensayo crónico con <i>Rhinella arenarum</i> -----	136
3.3.6 Bioensayo utilizando diluciones de sedimento-----	140
3.3.7. Interpretación integral de resultados obtenidos de la aplicación de la herramienta bioanalítica desarrollada y sus variantes-----	141

3.4 Discusión y Conclusión del capítulo-----

CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN DE LARVAS A CAMPO

4.1 Introducción

4.1.2 Anfibios como bioindicadores de calidad ambiental. -----	150
4.1.2 Factores que determinan la magnitud del impacto de la contaminación-----	152
4.1.2 Efectos subletales-----	153

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Área de estudio-----	157
4.2.2 Toma de muestras-----	158
4.2.3 Procesamiento y abordaje de la morfología larvaria-----	158
4.2.4 Atlas de anomalías-----	160
4.2.5 Análisis estadísticos-----	160

4.3 Resultados

4.3.1 Sitios de estudio-----	161
4.3.2 Muestreos-----	162
4.3.3 Análisis de la Morfología larvaria-----	163

4.3.4 Integración e Inferencia de la calidad ambiental-----	175
4.3.5 Nomenclatura unificada de Anormalidades-----	776
4.4 Discusión y Conclusiones-----	184
CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES-----	190
BIBLIOGRAFÍA -----	197
ANEXOS	
Anexo I-Producción Científica vinculada con la tesis -----	227
Anexo II-Lista de publicaciones ecotoxicológicas con referencia en anormalidades de anuros -----	229
Anexo III-Protocolo de Bioensayo -----	237
Anexo VI Tablas correspondientes al capítulo 3-----	245

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a todos aquellos que me acompañaron, guiaron y apoyaron en este camino.

Al CONICET, por su beca que permitió que me dedique exclusivamente a esta tesis.

A la UNLP y la FCNyM por brindarme una educación pública, gratuita y de calidad.

A mis directores, Guillermo Natale y Leandro Alcalde, por guiarme y brindarme siempre su apoyo durante estos años de trabajo.

A los jurados de la tesis por las sugerencias y correcciones realizadas.

Al CIM por otorgarme el lugar para desarrollar mis tareas y a toda su gente por la ayuda brindada en cada momento. En especial a Alicia Ronco (Nina) en su memoria por sus consejos, apoyo y ayuda. A Leticia Peluso quien en muchos sentidos cumplió tareas de directora sin serlo, a Pablo Demetrio y Federico Rimoldi por estar siempre respondiendo dudas y brindando una mano cuando la he necesitado y muy especialmente a los que conformaron y conforman el grupo Anfibio (Carolina, Nadia, Juan Manuel, Florencia, Evelina, Valeria, Emilia, Federico) por su compañerismo y apoyo constante, así como también a los pasantes que colaboraron activamente con la ejecución de esta tesis.

A Horacio Beláustegui, quien me abrió las puertas de su fundación y me acercó al estudio de los anfibios.

A mi familia que siempre me apoyó incondicionalmente. A mis padres, por darme la posibilidad de estudiar e incentivar me a hacerlo y por enseñarme a no bajar los brazos. A mis hermanos, por estar siempre. A mis sobrinos por llenarme de felicidad. A mis tías, tíos, primos y primas por su incondicional apoyo desde el inicio y por estar siempre atentos a las salidas de ranas y sapos para avisarme. A Mónica y Roberto por el apoyo y acompañamiento.

Agradezco a mis abuelos, por motivarme el espíritu y a seguir los sueños.

A Agustín, por ser mi compañero de vida, por su apoyo y paciencia.

A mis amigos, Agustina, Agustín, Maila, Milagros, Nadia, Nicole, Patricio y Sabrina, con quienes compartí largos años de la carrera de grado y a quienes vuelvo a elegir para compartir mi vida.

RESUMEN

Las actividades antrópicas generan presiones ambientales que en muchos casos superan la capacidad de depuración, adaptación y regulación de los patrones normales de estabilidad que poseen los ecosistemas, poniendo en riesgo su integridad y la calidad del ambiente. Este trabajo de tesis doctoral en su concepción y desarrollo se ubica en el seno de la Ecotoxicología, una disciplina científica emergente que provee estrategias de evaluación y diagnóstico de los efectos de la contaminación sobre los ecosistemas y los elementos que los componen.

Considerando por un lado, que los anfibios poseen ciertas características biológicas que los disponen como especies indicadoras, útiles para medir efectos causados por cambios locales en el ambiente, y que la ocurrencia de anomalías morfológicas en individuos presenta relevancia biológica, se planteó desarrollar, a partir del estudio detallado de la presencia de anomalías y alteraciones en los patrones normales del desarrollo de larvas de dos especies autóctonas (*Boana pulchella* y *Rhinella arenarum*), valores de referencia que permitan utilizar la ocurrencia de diferentes tipos de anomalías y su frecuencia de aparición como biomarcadores (puntos finales de evaluación ecotoxicológicos), y a su vez utilizar a los anuros como bioindicadores de calidad ambiental para finalmente promover su empleo e incorporación en estrategias de diagnóstico ambiental.

El desarrollo del plan de trabajo se presenta en 4 capítulos en los que se abordan de manera detallada los objetivos específicos. Estos siguen un orden que refleja el avance en la investigación y hacia el final se integran los resultados en virtud de alcanzar el objetivo general.

En el primer capítulo se presenta una descripción del área de estudio, la cual se ubica en la Ciudad de La Plata y alrededores. Dentro del área de estudio se identificaron 4 problemáticas ambientales evidentes: Agricultura, Urbanismo, Industrialización y Descargas cloacales. Además, se seleccionó un área como zona de referencia, con características ambientales similares, pero sin influencia directa de estas actividades antrópicas. Dentro de estas zonas se seleccionaron un total de 28 sitios de estudio, los que cumplieron con ciertos criterios de accesibilidad, influencia de actividades antrópicas e indicios evidentes de contaminación. En cada sitio se realizó una caracterización fisicoquímica de la calidad del agua y sedimentos. Complementariamente, se realizó una revisión exhaustiva de trabajos científicos publicados que presentaran información de la presencia de contaminantes en las zonas de estudio. La interpretación conjunta de los resultados obtenidos y de la información proveniente de las publicaciones existentes permitió caracterizar los sitios de estudio en relación con las problemáticas que los afectan. A partir de datos cedidos por el Servicio Meteorológico Nacional se realizó una caracterización climática del periodo estudiado (2015-2018) y una comparación con el comportamiento normal esperado según los datos del periodo 1981-2010. Las fluctuaciones en las variables ambientales registradas se asociaron con la actividad

reproductiva de las especies estudiadas, y permitieron explicar eventos particulares. Los relevamientos de las especies de anuros, siguiendo métodos normalizados, permitieron determinar la riqueza de especies en cada sitio. En los sitios de referencia se hallaron un total de 13 especies (entre ellas las dos especies seleccionadas), en el resto de los sitios la riqueza específica fue menor. Los resultados obtenidos permitieron distinguir a las especies, *Scinax squalirostris*; *Scinax granulatus*; *Odontophrynus americanus*; *Ceratophrys ornata*; *Leptodactylus gracilis* como candidatos para ser utilizados como indicadores. Para una de las especies seleccionadas (*Boana pulchella*), y con la intención de lograr la reproducción en cautiverio, se realizaron estudios detallados de aspectos reproductivos. A saber, se realizaron monitoreos en sitios de referencia obteniéndose datos morfométricos de hembras y machos en diferentes etapas del ciclo reproductivo, lo que permitió determinar el estado óptimo para la reproducción. Los individuos colectados fueron utilizados para la inducción artificial de la reproducción mediante el método AMPHIPLEX en reiteradas oportunidades. El método resultó exitoso en dos ocasiones y en la totalidad de las inducciones se evidenciaron respuestas a nivel reproductivo: emisión de canto nupcial y coloración del saco bucal en machos, formación de amplexos, y colocación de huevos siguiendo los patrones normales descritos para la especie.

En el segundo capítulo se describe el desarrollo normal de larvas de *B. pulchella* y *R. arenarum* en condiciones de laboratorio. Para ello se colectaron puestas en los sitios de referencia y se mantuvieron en condiciones controladas de laboratorio realizando extracciones (mediciones y fijaciones) de individuos a intervalos de tiempo regulares. Dichos procedimientos permitieron obtener información suficiente para calcular de manera precisa las tasas de crecimiento, desarrollo y supervivencia, y realizar una descripción cuali y cuantitativa del desarrollo larval normal de las especies de estudio y establecer los parámetros estimados como valores de referencia. Una vez estudiados los caracteres morfológicos normales de las larvas y valores de referencia, se procedió a caracterizar las anomalías presentes en larvas como consecuencia de su exposición a contaminantes. En una primera instancia se realizó un estudio comparativo de las anomalías presentes en larvas de *Rhinella arenarum* procedentes de bioensayos, mediante los cuales las larvas fueron expuestas a 10 contaminantes de relevancia ambiental incluyendo metales y plaguicidas. Dicho análisis permitió identificar más de 20 tipos de anomalías. Luego, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva de publicaciones que informaran sobre la presencia de anomalías en larvas de anfibios. Se analizaron en detalle y se realizaron comparaciones entre las descripciones buscando identificar patrones comunes, así como también detectar diferencias, desacuerdos y contradicciones. Finalmente, se propuso una lista con la nomenclatura revisada y unificada, acompañada de una descripción de cada una de las anomalías junto con una valoración de su gravedad según su implicancia en la supervivencia de los individuos. Esta lista sirvió de guía para la identificación de las anomalías detectadas en los bioensayos y en las larvas de campo (Capítulos siguientes). Los resultados permiten asociar la expresión de anomalías con la exposición a

determinados factores de estrés, esto aporta evidencias para proponer la presencia de anomalías en larvas de anuro como punto final de evaluación. En el capítulo 3 se describe en detalle la adecuación y puesta a punto de los bioensayos de toxicidad con sedimentos que plantea la incorporación de larvas de especies autóctonas. Para ello se evaluó el patrón de respuesta a nivel individual (efectos letales y subletales) de larvas de *B. pulchella* y *R. arenarum* expuestas a sedimentos provenientes de los sitios de estudio. Inicialmente, los protocolos de bioensayos con sedimentos y larvas de anuros estandarizados por USEPA (1996) y ASTM (2007) se analizaron en detalle. Además, se cotejó la información existente sobre la biología, ecología y cría de las larvas de las especies de estudio. Con la información obtenida se determinaron las mejores condiciones para cada especie y se confeccionó un protocolo. Una vez establecido el protocolo se puso a prueba con numerosos ensayos, los que permitieron evaluar su utilidad, su practicidad y realizar ajustes y mejoras. La adecuación y puesta a punto de los protocolos normalizados para ser utilizados con las especies autóctonas propuestas, se llevó a cabo exitosamente. Se realizaron un total de 12 bioensayos en los que se evaluaron los siguientes puntos finales: mortalidad, crecimiento, desarrollo, comportamiento y presencia y frecuencia de anomalías. Una de las variaciones del protocolo consistió en realizar bioensayos empleando estadios más tempranos del desarrollo como lo es el estadio (STD) 8 (blástula con segmentación media), considerando que la exposición en etapas tempranas del desarrollo aumentaría la probabilidad de ocurrencia de malformaciones, lo que provocaría un aumento no solo en el número (frecuencia de ocurrencia), sino en la gravedad de las anomalías evaluadas. Posteriormente, y con el objetivo de conocer la sensibilidad de las diferentes etapas del desarrollo, se realizaron bioensayos con sedimentos en tres etapas relevantes: embriones en STD 8 y larvas en STD 25 y 30. Esto permitió conocer la sensibilidad de la respuesta en cada etapa y realizar comparaciones, posibilitando obtener información muy valiosa para el desarrollo de la herramienta propuesta. Finalmente, con el objetivo de obtener información complementaria que permita comprender la respuesta de la herramienta y su versatilidad, se probó el procedimiento propuesto realizando un ensayo de exposición a sedimentos desde STD 8 (embrión) hasta la metamorfosis con la especie *Rhinella arenarum*. Este permitió obtener información valiosa sobre la respuesta en diferentes etapas y corroborar algunas hipótesis sobre la gravedad y consecuencia de las anomalías. Por otra parte, con el objetivo de obtener información más detallada sobre la toxicidad de los sedimentos que resultaron más tóxicos al evaluar mortalidad, se realizaron bioensayos empleando diluciones de dichos sedimentos, lo que permitió obtener información sobre efectos subletales. La totalidad de los bioensayos realizados en este capítulo permitió corroborar la factibilidad de los procedimientos desarrollados y la utilidad de la herramienta bioanalítica propuesta, la que demostró ser sencilla, práctica, de bajo costo y precisa en cuanto a sus resultados. La aplicación de esta herramienta permitió clasificar los sedimentos provenientes de los sitios estudiados según su toxicidad. Además, el empleo de la ocurrencia y frecuencia de anomalías, como posible biomarcador y punto final de evaluación, resultó ser una herramienta útil que brinda información relevante y complementaria al empleo de puntos

finales usados convencionalmente (mortalidad, crecimiento y desarrollo). Los resultados obtenidos en este capítulo, constituyen líneas de evidencia a favor de la utilidad de *B. pulchella* como especie modelo de estudio sensible y útil al momento de evaluar efectos en ecosistemas acuático y evidencia la importancia de evaluar la exposición desde etapas tempranas del desarrollo. Por último, en el capítulo 4 se emplea el conjunto de caracteres morfológicos externos propuestos en los capítulos 2 y 3, incorporando el análisis de caracteres morfológicos internos para evaluar grupos de larvas provenientes de los sitios de estudio. Para ello se consideraron los sitios en los que se detectó la presencia y reproducción de ambas especies estudiadas, y se realizaron muestreos a lo largo del ciclo larval. Las larvas colectadas fueron anestesiadas y fijadas en formol para posteriores análisis en laboratorio. Cada larva fue analizada en detalle bajo lupa estereoscópica determinando y registrando la presencia de anormalidades, además de variables como tamaño y estadio del desarrollo. Con fines comparativos, se seleccionaron grupos de larvas de aspecto normal, y grupos de larvas malformadas, en estadios avanzados, y se procedió a la disección y prospección de anomalías en los órganos internos. Complementariamente, algunos individuos fueron procesados con tinciones que permitieron analizar el desarrollo del condrocraáneo y la musculatura mandibular. Los resultados permitieron estimar la frecuencia de ocurrencia de anormalidades y comparar el patrón de respuesta de las larvas expuestas mediante bioensayos con las observaciones realizadas de larvas procedentes de los sitios de estudio. Ello posibilitó corroborar no solo la versatilidad y utilidad de la herramienta aquí propuesta sino también su aplicación en campo. La interpretación de los resultados obtenidos y su contextualización en el marco teórico aquí expuesto, permiten concluir que la presencia de larvas de diferentes especies de anuros, brinda información sobre la calidad del ambiente. Por otro lado la evaluación de puntos finales subletales en larvas de anuros provenientes de ecosistemas acuáticos naturales y antropizados, brindan información que permite inferir la calidad del ambiente y el estado del ecosistema. El hallazgo en el campo de larvas anormales posee gran relevancia ecológica y es un indicador de la ocurrencia previa de un evento de estrés sobre el ecosistema. Considerando los resultados obtenidos y la experiencia adquirida, finalmente se propuso un atlas de anormalidades con la nomenclatura revisada y unificada, acompañado de una descripción de cada una de las anomalías junto con una evaluación de su severidad de acuerdo a su implicación en la supervivencia de los individuos.

ABSTRACT

Anthropic activities generate environmental pressures that frequently exceed the purification, adaptation and regulation capacity of ecosystems, putting at risk their integrity and the quality of the environment. This thesis was formulated and developed within the Ecotoxicology, an emerging scientific discipline that provides strategies for evaluation and diagnosis of the effects of pollution on ecosystems and their elements. In this context, it was considered that amphibians have certain biological characteristics that make them useful indicator species to measure effects caused by local changes in the environment, and that the occurrence of morphological abnormalities in individuals has biological relevance. Therefore, the development of reference values that allow the use of the occurrence of different types of abnormalities and their frequency of appearance as biomarkers (endpoints of ecotoxicological evaluation), and the use of anurans as bioindicators of environmental quality to finally promote their employment and incorporation into environmental diagnostic strategies was proposed. Such values were developed from the detailed study of the presence of abnormalities and alterations in the normal patterns of development of larvae of two native species (*Boana pulchella* and *Rhinella arenarum*), reference values that allow the occurrence of different types of abnormalities and their frequency of appearance to be used as biomarkers (ecotoxicological evaluation endpoints), and in turn use anurans as bioindicators of environmental quality to finally promote their use and incorporation into environmental diagnostic strategies.

The development of this study is presented in four chapters in which specific objectives are addressed in detail. These follow an order that reflects the progress in the investigation. The results are integrated towards the end to reach the overall objective.

The first chapter presents a description of the study area, which is in the City of La Plata and surroundings. Within the study area, four apparent environmental problems were identified: Agriculture, Urban Planning, Industrialization and Sewer Discharges. In addition, an area was selected as a reference zone, with similar environmental characteristics but without direct influence of these anthropic activities. Within these areas, a total of 28 study sites were selected, which met certain criteria of accessibility, influence of anthropic activities and signs of contamination. A physicochemical characterization of water and sediment quality was performed at each site. In addition, an exhaustive review of published scientific papers that presented information on the presence of contaminants in the study areas was carried out. The joint interpretation of the results obtained and the information from the existing publications allowed characterizing the study sites in relation to the problems that affect them. Based on data provided by the National Meteorological Service, a climatic characterization of the period studied (2015-2018) and a comparison with the expected normal behavior according to the data for the period 1981-2010 were made. Fluctuations in the environmental variables recorded were associated with the reproductive activity of the study species and allowed to explain particular events. Anurans sampling, following standardized methods, allowed to determine the species richness in each site. A total of 13 species were found in the reference sites (including the two selected species) while in the rest of the sites the specific richness was lower. The results obtained allow us to distinguish the

species, *Scinax squalirostris* ; *Scinax granulatus* ; *Odontophrynus americanus* ; *Ceratophrys ornata* ; *Leptodactylus gracilis* as candidates to be used as indicators. For one of the selected species (*Boana pulchella*), and with the intention of achieving captive reproduction, detailed studies of reproductive aspects were carried out. Thus, monitoring was carried out at reference sites obtaining morphometric data of females and males at different stages of the reproductive cycle, which allowed to determine the optimal state for reproduction. Collected individuals were used for artificial induction of reproduction using the AMPHIPLEX method on several occasions. The method was successful twice. In all the inductions, normal reproductive behavior was registered: emission of mating calls and pigmented vocal sac in males, amplexus, and laying of eggs following the normal patterns described for the species. The second chapter describes the normal development of larvae of *B. pulchella* and *R. arenarum* under laboratory conditions. Clutches of both species were collected at the reference sites and kept under controlled laboratory conditions. Extractions of individuals (measurements and fixations) were performed at regular intervals of time. These procedures allowed obtaining enough information to accurately calculate growth, development and survival rates, and to make a qualitative and quantitative description of the normal larval development of the study species and to establish the estimated parameters as reference values. Once the normal characters of the larvae were studied, we proceeded to characterize the abnormalities in larvae exposed to contaminants. First, a comparative study of *Rhinella arenarum* larval abnormalities exposed to 10 environmentally relevant contaminants, including metals and pesticides, was carried out. This analysis allowed identifying more than 20 types of abnormalities. Then, an exhaustive literature search of publications that reported on the presence of abnormalities in amphibian larvae was performed. They were analyzed in detail and comparisons were made between the descriptions seeking to identify common patterns, as well as to detect differences, disagreements and contradictions. Finally, a list with the revised and unified nomenclature was proposed, accompanied by a description of each of the abnormalities along with an assessment of their severity according to their implication in the survival of the individuals. This list served as a guide for the identification of abnormalities detected in bioassays and field larvae. The results allow associating the expression of abnormalities with exposure to certain stress factors, this provides evidence to propose the presence of abnormalities in anuran larvae as an evaluation end point.

Chapter 3 describes in detail the adequacy and development of sediment toxicity bioassays with the incorporation of larvae of native species. Accordingly, the response pattern at the individual level (lethal and sublethal effects) of larvae of *B. pulchella* and *R. arenarum* exposed to sediments from the study sites was evaluated. Initially, the bioassay protocols standardized by USEPA (1996) and ASTM (2007), with sediments and anuran larvae, were analyzed in detail. In addition, the existing information on the biology, ecology and breeding of the larvae of the study species was compared. Then, the best conditions for each species were determined and a protocol was developed. Once the protocol was established, it was tested with numerous bioassays, which allowed evaluating its usefulness and making adjustments and improvements. The adaptation and fine-tuning of the standard protocols to

be used with the proposed native species was carried out successfully. A total of 15 bioassays were performed in which the following endpoints were evaluated: mortality, growth, development, behavior, and presence and frequency of abnormalities.

One of the introduced variations in the protocol was to perform bioassays using earlier stages of development such as stage (STD) 8 (blastula with medium segmentation), considering that an exposure in early stages of development would increase the probability of occurrence of malformations, which would cause an increase not only in the number (frequency of occurrence), but in the severity of the abnormalities evaluated.

Subsequently, and with the objective of knowing the sensitivity of the different stages of development, bioassays with sediments were performed in three relevant stages of development: embryos in STD 8, and larvae in STD 25 and 30. This allowed knowing the sensitivity of the response at each stage and making comparisons, making it possible to obtain very valuable information for the development of the proposed tool. Finally, in order to obtain complementary information that allows understanding the response of the tool and its versatility, the proposed procedure was tested by performing a sediment exposure test from STD 8 (embryo) to metamorphosis with *Rhinella arenarum*. This allowed obtaining valuable information about the response at different stages and corroborating some hypotheses about the severity and consequence of the abnormalities. On the other hand, in order to obtain more detailed information on the toxicity of the sediments that were more toxic when assessing mortality, bioassays were performed using dilutions of these sediments, which allowed obtaining information on sublethal effects. The totality of the bioassays carried out in this chapter allowed us to corroborate the feasibility of the procedures developed, and the usefulness of the proposed bioanalytical tool, which proved to be simple, practical, inexpensive and precise in terms of its results. Its application allowed classifying the sediments of the study sites according to their toxicity. In addition, the use of the occurrence and frequency of abnormalities, as a possible biomarker and endpoint of evaluation, proved to be a useful tool that provides relevant and complementary information to the use of frequently used endpoints (mortality, growth and development). The results obtained in this chapter constitute lines of evidence in favor of the utility of *B. pulchella* as a sensitive and useful study model species when evaluating effects on aquatic ecosystems, and shows the importance of evaluating exposure from early stages of development

Finally, in chapter 4 the set of external morphological characters proposed in chapters 2 and 3 is used, incorporating the analysis of internal morphological characters to evaluate groups of larvae from the study sites. The study sites considered were those where the presence and reproduction of both species were detected. There, samples were taken throughout the larval cycle. The larvae collected were anesthetized and fixed in formalin for further laboratory analysis. Each larva was analyzed in detail under a stereoscopic magnifying glass determining and recording the presence of abnormalities, as well as variables such as size and stage of development. For comparative purposes, groups of larvae of normal and malformed appearance, in advanced stages of development, were selected for dissection and prospecting of abnormalities in internal organs. In addition, some individuals were processed

with stains that allowed analyzing the development of the chondrocranium and mandibular musculature. The sampling results allowed us to estimate the frequency of occurrence of abnormalities, and compare the response pattern of the larvae exposed by bioassays with the observations made on larvae from the study sites. This made it possible to corroborate not only the versatility and usefulness of the tool proposed here but also the established procedure and its sensitivity. The interpretation of the results obtained and their contextualization in the theoretical framework presented here, allow us to conclude that the presence of larvae of different species of anurans provides information on the quality of the environment. On the other hand, the evaluation of sublethal endpoints in anura larvae from natural and anthropized aquatic ecosystems provide information that allows us to infer the quality of the environment and the state of the ecosystem. The finding in the field of abnormal larvae has great ecological relevance and is an indicator of the previous occurrence of a stress event on the ecosystem. Considering the results obtained and the experience acquired, finally, an atlas of abnormalities with the revised and unified nomenclature was proposed, accompanied by a description of each of the anomalies together with an evaluation of its severity according to its implication in the survival of the individuals.

INTRODUCCIÓN GENERAL

ACTIVIDADES ANTRÓPICAS Y DEGRADACIÓN DEL AMBIENTE

La población humana en los últimos siglos ha alcanzado los 7.600 millones de habitantes (WWF., 2016). Este crecimiento trae aparejado un aumento en la demanda de alimentos, agua y vivienda entre otras cosas. La historia muestra que la forma que el ser humano eligió para realizar estas actividades y satisfacer sus necesidades modifica el estado y funcionamiento del planeta (Jordan *et al.*, 1990).

La organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) definen al uso del suelo como el total de acuerdos, actividades e insumos que las personas realizan en un cierto tipo de cobertura de la tierra (FAO & PNUMA, 1999). Esto abarca una amplia variedad de actividades que se desarrollan con diferente intensidad y a diferentes escalas. Como se puede observar en la Figura 1, la agricultura y la producción de alimentos, la industria en general, la producción de energía y la urbanización son algunas de las actividades antrópicas que están transformando la superficie terrestre y la biosfera, alterando sus ciclos biogeoquímicos y generando diferentes problemas ambientales tales como contaminación, modificación, fragmentación, y destrucción de hábitats entre otros. Estos cambios o modificaciones a nivel global, regional y local generan efectos adversos sobre los componentes de la biota y los procesos que ocurren en los ecosistemas a diferentes niveles (Steffen *et al.*, 2006) (Figura 1).

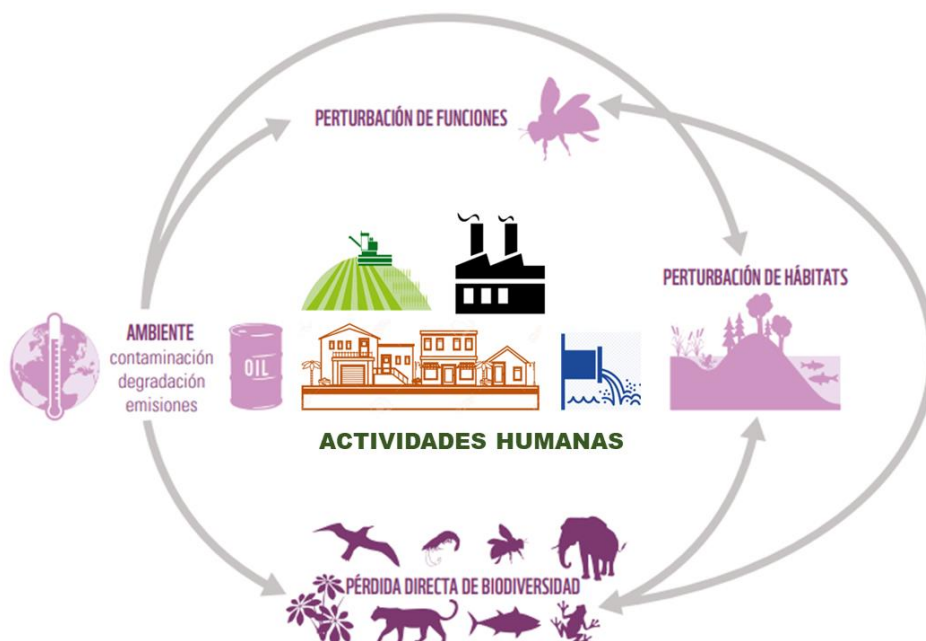


Figura 1. Modelo conceptual que ilustra los efectos directos e indirectos de las actividades humanas en la tierra (modificado de Grooten & Almond, 2018).

Como se dijo previamente uno de los problemas ambientales más preocupantes desde el punto de vista de la calidad del ambiente es la contaminación química. Se considera

contaminante a cualquier sustancia, que ingresa en un sistema natural, y que al superar ciertos niveles de concentración produce un efecto perjudicial neto sobre su entorno o sobre algo de valor en ese entorno (Manahan, 2011). El registro de sustancias químicas CAS (Chemical Abstracts Service), identifica en la actualidad más de 144 millones de sustancias orgánicas e inorgánicas. Considerando que se conoce el efecto tóxico que producen solo el 20% de estas sustancias y que diariamente se incorporan al mercado aproximadamente 15.000 nuevas sustancias, existe una necesidad de tomar medidas preventivas e impulsar las investigaciones relacionadas con estas sustancias, sus propiedades, su comportamiento ambiental, los efectos sobre la biota y el riesgo que implican para la salud de los ecosistemas (Persson *et al.*, 2013).

Existen numerosas clasificaciones de contaminantes, siendo una de ellas, la que diferencia contaminantes orgánicos e inorgánicos. Los contaminantes orgánicos son los que provienen de organismos vivos y los inorgánicos son aquellos que se originan de los minerales (Walker, Sibly, & Peakall, 2016). Muchos contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos, han sido sintetizados y producidos intencionalmente para ejercer un efecto tóxico sobre alguna especie considerada como plaga, por ejemplo: insecticidas, herbicidas, fungicidas, conservantes de la madera y arsenato de sodio, los cuales constituyen un problema al ingresar en los diferentes compartimentos ambientales e interactuar con los componentes de la biota (especies no blanco) (Adeola, 2004). Por otra parte, hay muchas sustancias sintetizadas con otros fines, por ejemplo, desengrasantes, disolventes y diversos subproductos industriales o productos farmacéuticos, los cuales están diseñados para el bienestar de las personas, pero luego de ser liberados en el ambiente pueden presentar toxicidad y causar problemas ambientales (Besada, González, & Schultze, 2006).

Los contaminantes, una vez liberados al ambiente, al igual que toda sustancia, ingresan en los ecosistemas y rara vez permanecen en el sitio donde ocurre la descarga, estos se transportan, se distribuyen entre los diferentes compartimentos ambientales como ser el aire, el agua, el suelo y los sedimentos (Klein, 1989; Wang, Sun, & Yao, 2016). Otra característica preocupante es la posibilidad de que estos compuestos puedan ingresar en la biota (bioacumulación, biomagnificación), alcanzando concentraciones más elevadas que las presentes en el medio, aumentando la concentración a medida que se avanza en el nivel trófico de la cadena alimenticia e incluso biotransportarse, en los tejidos corporales de los animales.

El destino de los contaminantes es a su vez bastante variable si consideramos que estos pueden, a lo largo de su transporte, transformarse en productos finales diferentes a la forma química en la que se emitieron inicialmente. Estos nuevos productos químicos (metabolitos ambientales) pueden ser menos tóxicos que los originales o inofensivos o lo que es peor aún, transformarse en una molécula más tóxica que la que fue liberada inicialmente (Daley, Paterson, & Drouillard, 2014).

ECOTOXICOLOGÍA

Según Forbes, (1993) “El campo de estudio, que integra los efectos ecológicos y toxicológicos de los contaminantes químicos en las poblaciones, comunidades y ecosistemas con el destino (transporte, transformación y descomposición) de dichos contaminantes en el medio ambiente” es la Ecotoxicología. Si bien las definiciones y alcances de esta ciencia están siendo continuamente discutidos, lo que no escapa a ninguna de las definiciones es que esta ciencia aborda el estudio de la interacción entre los contaminantes y los ecosistemas (Newman, 2014).

La Ecotoxicología es una ciencia de síntesis que integra a las disciplinas conocidas como ciencias ambientales, las que dentro de su paradigma estudian el destino y transporte de los compuestos químicos. Aborda temas desde la química y la física y por otro lado busca respuestas sobre el efecto de los estresores ambientales y lo hace a diferentes niveles (sean estos de organización de la materia, como los jerárquicos ecológicos) como ser el nivel genético-molecular, bioquímico, organismo, poblacional y los niveles de organización ecológico como paisaje, biosfera (por ejemplo, cambio climático global) (Newman, 2014).

Con el fin de mantener la coherencia conceptual entre las escalas jerárquicas y especialidades asociadas, la ecotoxicología toma la idea desarrollada por Caswell, (1996) en la cual los procesos en un nivel toman sus explicaciones de los procesos ocurridos al nivel inmediato inferior, y realizan inferencias sobre las consecuencias en el nivel inmediato superior. (Newman & Clements, 2007), introducen el término holón, definido por Koestler (1991), como cada unidad de un sistema jerárquico y proponen un esquema representado por la concatenación causa-efecto-significancia, siendo la unidad con la que uno debe moverse entre los holones de esa ciencia jerárquica (Figura 2).



Figura 2. Esquema de la concatenación o cascada “explicación-observación-significancia” para niveles adyacentes dentro de la estructura jerárquica. Traducido de Newman y Clements (2007).

La relación causa-efecto-significancia puede ser visualizada de manera sencilla empleando un modelo predictivo de tipo caja negra, el cual es utilizado para corroborar hipótesis simples (causa-efecto). Este modelo, si bien no explica los procesos que suceden dentro de la caja, permite adjudicar al factor estudiado (variable independiente), la culpabilidad de generar el efecto observado. La medición de los efectos, a su vez, se realiza habitualmente como diferencias significativas en la magnitud de la variable de respuesta del grupo tratado (variable dependiente) respecto al grupo no tratado denominado grupo control, en otras palabras, se estudian efectos entendidos como negativos o adversos para el sistema estudiado respecto de la normalidad (Figura 3). De esta forma por ejemplo se puede evaluar la relación concentración-respuesta, como el número de moléculas de un contaminante en un compartimento ambiental determinado (concentración), las cuales entran en contacto con el organismo estudiado (organismo de prueba), siendo la variable de respuesta denominada punto final de evaluación. Los métodos para analizar los datos obtenidos de un bioensayo (estimación de la curva concentración-respuesta) se basan en el concepto de tolerancia individual. Según este concepto, existe una dosis o concentración umbral necesaria para matar a un individuo en particular, ya que cada individuo presenta una tolerancia individual característica.

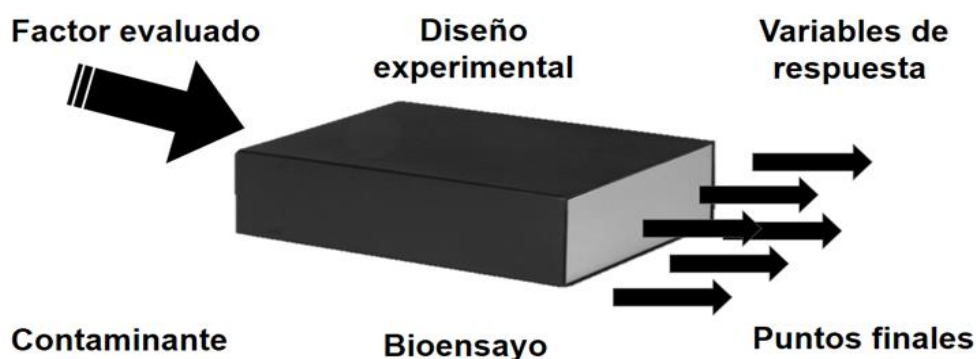


Figura 3. Modelo de caja negra, utilizada para esquematizar la relación causa-efecto observada al evaluar un factor (Contaminante) mediante el diseño experimental (Bioensayo) midiendo las variables de respuesta (Puntos finales).

BIOENSAYOS

En el presente trabajo de tesis se utiliza el bioensayo de toxicidad (caja negra) como la herramienta experimental y bioanalítica. Éste, tal como lo definió Finney (1952) es "un experimento realizado para estimar la naturaleza, constitución o potencia de un material (o de un proceso), por medio de una reacción que se aplica a la materia viviente". El concepto de bioensayo derivado de la Toxicología clásica ha sido modificado, adaptado y extendido al diagnóstico y manejo ambiental dentro del campo de la Ecotoxicología. De manera resumida la realización de un bioensayo implica la aplicación, de manera controlada, de un estímulo externo conocido a un organismo prueba cuya respuesta al

estímulo (cambio de alguna característica biológica o del estado del organismo prueba) es considerada como efecto (Lewis, 1998; USEPA, 2000).

El desarrollo histórico de la toxicología acuática y el empleo de bioensayos hasta 1970 ha sido resumido en detalle por Rand, Wells, & McCarty (1995). La mayoría de los ensayos de toxicidad consistieron en la exposición a corto plazo de productos químicos o efluentes a un número muy reducido de especies, sin contar con procedimientos estandarizados (Carpenter, 1924; Penny & Adams, 1863; Weigelt, Saare, & Schwab, 1885). Los primeros procedimientos estandarizados o normalizados surgieron de la publicación de Doudoroff (1951), en los cuales se incluyeron métodos estandarizados para la evaluación de toxicidad de aguas y aguas residuales. De esta forma se comenzaron a estandarizar los ensayos empleando especies acuáticas y la agencia de protección ambiental (EPA) patrocinó un taller que dio como resultado un documento titulado Métodos Estándar para Pruebas de Toxicidad Aguda para Peces e Invertebrados, que sirvió de base y permitió el posterior desarrollo de estándares acuáticos en todo el mundo.

McKee (1952), publicó un informe titulado Water Quality Criteria (WQC) (Criterios de calidad del agua), esta publicación proporcionó orientación sobre valores de concentraciones químicas de referencia para juzgar límites de variación o alteración de la calidad del agua. (McKee & Wolf, 1963) ampliaron la lista de productos químicos y generaron una base de datos de toxicidad. La EPA publicó pautas formales para el establecimiento de WQC para la vida acuática que fueron revisadas posteriormente en 1985 (EPA, 1986). Estos documentos sentaron las bases y lineamientos para el desarrollo de numerosas herramientas, que permitieron que, en la actualidad, se encuentren disponibles métodos estandarizados para numerosas especies de agua dulce y marinas, incluyendo peces, invertebrados y algas, que habitan en el agua y sedimentos.

Existen diferentes pruebas de toxicidad las cuales pueden agruparse según el tiempo de exposición al tóxico en agudas o crónicas. Los ensayos agudos son pruebas a corto plazo diseñadas para medir los efectos de los agentes tóxicos durante un corto período de su vida útil, estas evalúan los efectos sobre la supervivencia durante un período de 24 a 96 horas. Los ensayos de toxicidad crónica, por otro lado, están diseñados para medir los efectos de los tóxicos sobre una parte significativa del ciclo de vida del organismo, típicamente una décima o más del total de la vida. Los estudios crónicos evalúan generalmente los efectos subletales de los tóxicos a largo plazo en la reproducción, el crecimiento y el comportamiento por alteraciones fisiológicas y bioquímicas (USEPA, 1996). La Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM), Environment Canada y la Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (USEPA) han publicado guías estandarizadas sobre cómo realizar estudios agudos y crónicos.

Si bien los bioensayos más utilizados son los que evalúan efecto de un solo compuesto sobre una especie determinada, también existen bioensayos específicos que evalúan mezclas de compuestos, e incluso la evaluación de la toxicidad de muestras provenientes de los diferentes compartimentos ambientales como son el agua, el suelo y el sedimento (Ver capítulo 3).

ANFIBIOS ANUROS COMO BIOINDICADORES

Los anfibios son un grupo de vertebrados abundantes y funcionalmente importantes en la mayoría de los ecosistemas acuáticos dulceacuícolas y terrestres, poseen ciertas características biológicas que los disponen como especies indicadoras, útiles para medir efectos provocados por cambios locales en el ambiente (Blaustein & Kiesecker, 2002; Wake, 1991; Welsh Jr & Ollivier, 1998). Estas características particulares son, por ejemplo, la presencia de una piel muy permeable (desnuda: sin faneras), comparada con otros vertebrados, la cual tiene un rol importante en el intercambio de gases y la osmorregulación. Esto los hace particularmente sensibles a los cambios en las condiciones fisicoquímicas del agua, la presencia de contaminantes y susceptibilidad a enfermedades de la piel. Otra característica es el rol que ocupan en las redes tróficas, ya que emplean diversos nichos tróficos, y a menudo sirven como presas abundantes e importantes debido a la biomasa que generan. La fisiología ectotérmica les permite explotar los recursos energéticos y, por lo tanto, servir como enlaces críticos entre los niveles tróficos más bajos y altos dentro de una comunidad. La ausencia de cáscara en sus huevos y su consecuente embriogénesis expuesta contribuye con su sensibilidad a diferentes factores ya sea físicos (UV) químicos (contaminantes ambientales) y biológicos (parásitos) desde etapas tempranas del desarrollo. Por otro lado, la dependencia de dos ambientes (acuático y terrestre) en su ciclo de vida hace que estos individuos estén expuestos a cualquier perturbación de la calidad o disponibilidad de los hábitats pudiendo interrumpir su ciclo de vida y afectar a las poblaciones. Por último, presentan un acotado “*home-range*” es decir que no realizan migraciones a grandes distancias y utilizan los mismos lugares para reproducirse (Blaustein, Wake, & Sousa, 1994; Brühl, Schmidt, Pieper, & Alscher, 2013; Hopkins, 2007). Estas características sumadas a su diversidad morfológica, el uso de hábitats y su presencia en la mayor parte de los ecosistemas, son las razones por las que han sido propuestos y utilizados como indicadores de la calidad ambiental (Attademo, Peltzer, & Lajmanovich, 2005; Blaustein & Wake, 1995; Guzy *et al.*, 2012; Paola M. Peltzer *et al.*, 2013). Por último estas características relativas a su sensibilidad, sumadas a la facilidad de cría y mantenimiento en laboratorio, permitieron el desarrollo y su incorporación como modelos útiles para llevar a cabo estudios ecotoxicológicos (Spurling, 2000).

A partir de 1990 los herpetólogos reconocieron la existencia del problema de la disminución numérica de las poblaciones de anfibios a nivel global (Barinaga, 1990; Beebe *et al.*, 1990; Belden & Blaustein, 2002). Al comienzo de las investigaciones, la falta de información sobre la biología y los parámetros normales individuales, y la dinámica de poblaciones no permitió determinar con precisión, si la disminución de las poblaciones de anfibios se debía a fluctuaciones normales en la naturaleza, o si realmente estaba ocurriendo una disminución numérica en las poblaciones a escala global a causa de factores antrópicos (Pechmann & Wilbur, 1994). Varios grupos de investigadores abordaron las problemáticas de la disminución numérica de las poblaciones de anfibios a nivel global. Estos aportaron evidencias que permitieron lograr un enfoque más claro al problema y comenzaron a explorar la naturaleza de sus causas y posibles soluciones.

Los primeros trabajos enfatizaron la necesidad de generar datos sobre el comportamiento y dinámica de poblaciones naturales de las diferentes especies de anfibios a nivel global (Blaustein *et al.*, 1994; Kuzmin, 1994; Wake, 1991). Es importante mencionar que, si bien se ha realizado un gran esfuerzo desde ese momento a esta parte, aun en la actualidad esta necesidad sigue vigente, y más aún en América del Sur.

La necesidad de comprender de manera global el estado actual de las poblaciones de anfibios llevó a la Unión internacional para la conservación de la naturaleza (UICN) a organizar la Global Amphibian Assessment (GAA) (Stuart *et al.*, 2004). Como estrategia de abordaje se dividió al mundo en regiones geográficas y se designó un coordinador regional para supervisar el proceso de evaluación en cada una de las regiones. Todas las especies conocidas de anfibios (6.500) se evaluaron según los criterios de la UICN para el estado de las especies (Stuart *et al.*, 2004). Los resultados de la GAA indicaron que se está produciendo una crisis real. Casi un tercio de las especies existentes (32,5%) se consideraron de interés para la conservación (categorías de la UICN "vulnerables"), aunque el estado del 22,5% de las especies no pudo evaluarse debido a la falta de información. En el 2007, con la actualización de la GAA se logró acumular datos adicionales (UICN, 2008).

Es importante destacar que las categorizaciones se realizan a partir de la participación de expertos con la información disponible, siendo este el mejor diagnostico que se puede hacer, pero falta mucha información ecológica de las poblaciones de anfibios, provenientes de monitoreos y estudios a largo plazo. Esta información no está disponible o resulta fragmentaria para la mayor parte de las especies de anfibios del mundo, situación que en Argentina es más notoria.

Stuart *et al.* (2004) discutieron los cambios en el estado de las poblaciones de anfibios entre 1980 y 2004, señalando que un total de 435 especies pasaron a categorías más altas de amenaza durante este período. También examinaron las amenazas para estas especies y encontraron que las amenazas principales eran la sobreexplotación de las especies, la fragmentación y pérdida de hábitats, y reconocieron una categoría denominada "disminuciones enigmáticas" que considera razones que no son completamente comprendidas. Otros autores han estudiado más detalladamente estas amenazas, por ejemplo, (Collins & Storfer, 2003), realizaron una revisión donde destacan las hipótesis más investigadas sobre la declinación global de los anfibios y las áreas que requieren investigación adicional. Las amenazas que destacan estos autores son la presencia de especies exóticas, la sobreexplotación de las especies, el cambio de uso de la tierra, el cambio climático (aumento de la radiación ultravioleta y el calentamiento global) el uso de pesticidas y otros contaminantes y el avance de enfermedades infecciosas.

ECOTOXICOLOGÍA DE ANFIBIOS

Los efectos de los contaminantes en anfibios comenzaron a estudiarse a partir de 1970, publicándose números trabajos (Birge, Black, & Kuehne, 1980). A partir de estos estudios se desarrollaron las primeras normas y protocolos estandarizados, las cuales fueron fundamentales para evaluar toxicidad de numerosas sustancias y construir bases de datos al respecto. Otro paso importante fue el desarrollo de pruebas de detección que podrían usarse para indicar toxicidad de agua de procesos, e incluso mezclas complejas empleando a *Xenopus Laevis* como especie modelo (Bantle, 1995; Dumont, Schultz, Buchanan, & Kao, 1983). El desarrollo de estos métodos condujo al protocolo para el Ensayo de Teratogénesis de Embriones de Rana -*Xenopus* (FETAX). El desarrollo de este tipo de herramienta y variantes aplicadas a diferentes casos continúa hasta la actualidad.

Semlitsch & Bridges, (2005) propusieron la incorporación a los bioensayos de un mayor realismo ecológico, utilizando especies nativas para las pruebas de toxicidad, comparando diferencias entre los diferentes modos de vida y las tasas de desarrollo de las especies, propusieron además la incorporación de la variabilidad genética como medida de representatividad, incluyendo en los bioensayos más de una especie de estudio. En la década pasada los estudios fueron orientados a evaluar efectos de múltiples estresores, y matrices complejas, alejándose de los estudios de un solo contaminante (Linder, Lehman, & Bidwell, 2010; Sparling, Linder, Bishop, & Krest, 2010).

En Argentina los primeros estudios ecotoxicológicos se enfocaron en evaluar la toxicidad de diferentes compuestos químicos (mayormente contaminantes de preocupación ambiental) evaluando mortalidad en bioensayos de tipo agudo y calculando la concentración, de una sustancia que causa mortalidad en el 50% de los animales expuestos durante un periodo determinado (CL50), para algunas especies de anuros autóctonos. Entre los grupos de trabajo que comenzaron esta línea de investigación se encuentra el grupo del Dr. Salibián, que publicó trabajos sobre larvas de *Rhinella arenarum* (sapo común) expuestas a diferentes plaguicidas en ensayos toxicológicos. En años posteriores los estudios comenzaron a incorporar, además de la mortalidad, otros puntos finales evaluados a nivel individual utilizando metales pesados y plaguicidas (Carolina M Aronzon, Sandoval, Herkovits, & Pérez-Coll, 2011; Julie C Brodeur, Svartz, Perez-Coll, Marino, & Herkovits, 2009; Herkovits & Helguero, 1998; Herkovits & Pérez Coll, 1993; Guillermo S Natale, Basso, & Ronco, 2000; Pérez-Coll, Herkovits, & Salibián, 1988). El Dr. Herkovits y colaboradores evaluaron efectos de varios contaminantes en la rana africana *Xenopus laevis* y el sapo *R. arenarum*; lo que posteriormente concluyó en el desarrollo del protocolo AMPHITOX (Herkovits, Perez-Coll, & Herkovits, 2002; Herkovits & Perez-Coll, 2003) este fue el primer protocolo o procedimiento estandarizado para una especie autóctona en nuestro país. Otros estudios de índole más ambiental incorporaron al enfoque ecotoxicológico bioensayos aplicados a la evaluación de la toxicidad de agua de ríos urbanos contaminados (Chiesa, Rosenberg, Fink, & Salibián, 2006; Demichelis, De La Torre, Ferrari, Garcia, & Salibian, 2001;

Salibián, 1992) y se comenzaron a realizar estudios con otras especies de anuros autóctonos (Bach, Marino, Natale, & Somoza, 2018; Costa, Ronco, Trudeau, Marino, & Natale, 2018; Guillermo Sebastián Natale, 2006; Juan Manuel Pérez-Iglesias *et al.*, 2016; C Salgado Costa, Ronco, Trudeau, Marino, & Natale, 2018).

Finalmente comenzaron a realizarse estudios asociados al uso de agroquímicos y los efectos que producen los herbicidas e insecticidas sobre larvas y adultos de anfibios. Estos estudios fueron abordados a diferentes niveles y escalas de estudio desde el nivel bioquímico (evaluando la actividad de las enzimas colinesterasas y de stress oxidativo), hasta el nivel individual (alteraciones morfológicas, etológicas y mortalidad) tanto en laboratorio como en anuros que habitan agroecosistemas (Attademo *et al.*, 2011; Lajmanovich, Attademo, Peltzer, Junges, & Cabagna, 2011; Paola M Peltzer *et al.*, 2008). En esta misma línea, hacia principios del año 2000 y hasta la actualidad, surgen nuevos estudios sobre el efecto de estresores ambientales, utilizando bioensayos de toxicidad aguda siguiendo los protocolos estandarizados (USEPA-ASTM) con pequeñas modificaciones para especies locales. Dichos estudios posteriormente fueron aplicados a evaluar efectos *in situ* en anuros autóctonos que habitan la provincia de Buenos Aires, mediante las investigaciones del grupo coordinado por el Dr. Natale. Estos estudios ponen énfasis en evaluar los efectos a diferentes escalas de organización y evalúan efectos principalmente a nivel individual con alteraciones morfológicas, etológicas, de crecimiento y desarrollo en especies representativas de los ecosistemas pampeanos (M. Agostini, Natale, & Ronco, 2009, 2010; Julie C. Brodeur, Suarez, Natale, Ronco, & Elena Zaccagnini, 2011; G. S. Natale, Ammassari, Basso, & Ronco, 2006; Guillermo S Natale *et al.*, 2000; Ruiz de Arcaute, Salgado Costa, Demetrio, Natale, & Ronco, 2012). En los últimos años y con el aumento de la interacción y colaboración con otros grupos de investigación, se fueron agregando nuevos puntos finales, como ser la evaluación de efectos genotóxicos y citotóxicos en larvas y adultos principalmente inducidos por exposición a diferentes formulados comerciales y principios activos de nuevos plaguicidas (Julie C. Brodeur, Candiotti, Soloneski, Larramendy, & Ronco, 2012; J. C. Brodeur, Vera Candiotti, Soloneski, Larramendy, & Ronco, 2012; Candiotti, Natale, Soloneski, Ronco, & Larramendy, 2010; De Arcaute *et al.*, 2014b; Nikoloff, Natale, Marino, Soloneski, & Larramendy, 2014; J. M. Pérez-Iglesias *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente la mortalidad y el crecimiento de los organismos ensayados son puntos finales a nivel individual comunes que pueden usarse con la mayoría de las especies, pero actualmente los ecotoxicólogos han planteado la necesidad de desarrollar nuevos biomarcadores utilizando especies autóctonas para evaluar problemas ambientales locales. La presencia de anomalías como punto final ha sido utilizada en numerosos trabajos ecotoxicológicos ya que se entiende que los diferentes estresores ambientales pueden afectar los procesos de organogénesis produciendo malformaciones o generar anomalías en órganos ya desarrollados. El estudio de este tipo de respuestas es altamente prometedor ya que tales efectos pueden explicar el vínculo entre los factores estresantes ambientales y el estado de las poblaciones de anuros. (Lannoo, 2008; Meteyer, 1997).

No obstante, a pesar de la información obtenida hasta el momento en estas investigaciones, aún persisten varias preguntas por resolver acerca de los efectos de contaminantes presentes en el ambiente sobre las especies de anuros autóctonos, en escenarios de exposición complejos, no solo por la cantidad de sustancias que pueden interactuar entre ellas, sino por las características fisicoquímicas de las matrices ambientales donde se encuentran mezclas complejas de contaminantes. Por lo tanto, la realización de bioensayos con sedimentos como herramienta bioanalítica, brinda un mayor realismo ecológicos y permite evaluar efectos de múltiples estresores, y matrices complejas (Ver capítulo 3).

En tal sentido el objetivo general de la presente tesis doctoral fue desarrollar, a partir del estudio detallado de la presencia de anomalías y alteraciones en los patrones normales de desarrollo de larvas de dos especies autóctonas, índices y valores de referencia que permitan utilizar estas especies de anuros como indicadores de calidad ambiental y su incorporación en estrategias de diagnóstico ambiental.

ESTUDIO DE CALIDAD AMBIENTAL CON LARVAS ANFIBIOS COMO BIOINDICADORES

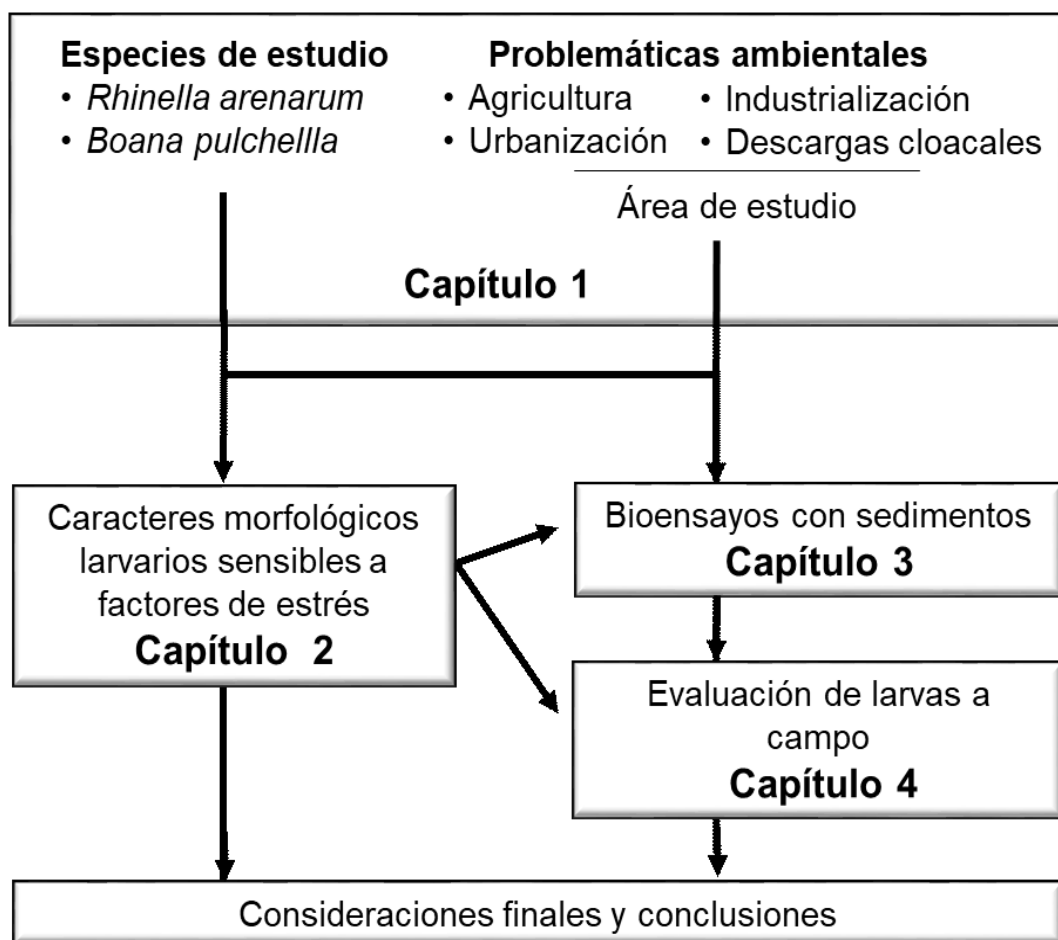


Figura 4. Esquema general del estudio realizado y la relación entre los capítulos del estudio.

El presente trabajo de tesis presenta la información en cuatro capítulos (Figura 4). En el primer capítulo se describe el área de estudio detallando las problemáticas ambientales abordadas, se caracteriza la calidad de los sitios, las especies estudiadas en dichas áreas y la puesta a punto de la inducción artificial de la reproducción en cautiverio de *Boana pulchella* mediante el método AMPHIPLEX. En el segundo capítulo se describe cualitativa y cuantitativamente la variabilidad de un conjunto de caracteres morfológicos externos a lo largo del desarrollo larval de *Boana pulchella* y *Rhinella arenarum* criadas en condiciones controladas de laboratorio. Esto permitió obtener información de la morfología normal de las larvas de anuros estudiadas y establecer los parámetros de referencia para el resto del estudio. A continuación, se identificaron y seleccionaron, a partir de información publicada y datos propios no publicados provenientes de estudios ecotoxicológicos, caracteres morfológicos externos más frecuentemente afectados en larvas de anuros. Esto permitió proponer una lista y descripción de las anormalidades que consideramos significativas y relevantes al momento de evaluar factores de estrés sobre larvas de anuros y aportar evidencias que permitan proponer la presencia de anormalidades en larvas de anuros como punto final de evaluación en el contexto ecotoxicológico. En el tercer capítulo se presentan los resultados de la evaluación del patrón de respuesta a nivel individual (efectos letales y subletales) de larvas de *B. pulchella* y *R. arenarum* en relación con la exposición a sedimentos provenientes de ecosistemas acuáticos afectados por distintos tipos de actividades antrópicas, mediante bioensayos estandarizados (ASTM-USEPA). Uno de los efectos subletales evaluados es la presencia de anormalidades para lo cual se aplica la herramienta desarrollada en el capítulo 2 (lista de anormalidades). En el capítulo cuatro se realizan comparaciones entre grupos de larvas de anuros colectadas en campo provenientes de los sitios de estudio aplicando la herramienta desarrollada y los puntos finales de evaluación propuestos. Por último, en la discusión y conclusiones finales se integra la información obtenida, se discute y se contextualiza en el marco teórico propuesto (paradigma actual de la Ecotoxicología), considerando el concepto de consiliencia, entendido como la unión de los conocimientos y la información proveniente de distintas disciplinas involucradas, para crear un marco unificado de entendimiento. Finalmente se presentan las conclusiones.

CAPÍTULO 1: ÁREA Y ESPECIES DE ESTUDIO.

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Descripción de los recursos naturales de Argentina

La República Argentina está situada en el Cono Sur de Sudamérica y presenta una superficie de 3,7 millones de km², siendo el segundo país más extenso de Latinoamérica y uno de los diez países más grandes del mundo (Brown, Martínez Ortiz, Acerbi, & Corcuera, 2006).

La ubicación latitudinal de la Argentina entre el Trópico de Capricornio y la región Antártica le confiere una enorme diversidad climática y ecorregional. Se encuentran ambientes de clima tropical húmedo (selvas subtropicales como las Yungas y la Selva Paranaense), bosques xerófilos (Chaco y Espinal), pastizales con fuertes variaciones de precipitaciones (Pampa) hasta ambientes de climas desérticos (Puna, Estepa Patagónica, Monte). El país se encuentra actualmente subdividido en dieciocho ecorregiones. De ellas, quince corresponden al área continental y las otras tres, a las islas del Atlántico Sur, a la Antártida Argentina y al Mar Argentino (Burkart, 2005).

Hay en la Argentina 48 Áreas Protegidas Nacionales (AP), entre las que cuentan los parques nacionales y otras unidades a cargo de la Administración de Parques Nacionales (APN), a las que se suma un número mucho mayor de áreas a cargo de otros órganos de gobierno (nacionales, provinciales o municipales de ONG y particulares). Estas áreas que protegen sitios silvestres son fragmentos donde se conserva la diversidad de vida y los recursos naturales, así como también los recursos culturales asociados.

Al presente, las 48 AP comprenden una superficie total de 14.796.251 ha del territorio nacional, según la base de datos actualizada en 2019 del Sistema de Información en Biodiversidad de la APN. El esfuerzo de preservación de las ecorregiones ha sido muy desigual. Hay ecorregiones que tienen más del 20% de su superficie protegida como las ecorregiones del Iberá, Puna y Bosques Patagónicos; otras presentan alrededor del 10% protegido como Altos Andes, Monte de Sierras y Bolsones, y Selva Paranaense, mientras que las ecorregiones restantes tienen menos del 5% protegido. Por lo dicho podemos afirmar que Argentina cuenta con valiosos recursos naturales, pero a pesar de los esfuerzos realizados por las organizaciones, los ambientes naturales no están completamente protegidos lo que conlleva a que la biodiversidad se encuentre en peligro.

1.1.2 Actividades antrópicas

Muchas de las áreas protegidas han quedado fragmentadas debido al uso del suelo en las regiones circundantes. Las estrategias adoptadas para proteger áreas son cada vez mayores, por ejemplo, el enfoque de corredores ecológicos es una estrategia para garantizar la conectividad y la funcionalidad de los ecosistemas, así como también la supervivencia de la biodiversidad contenida en ellos (Frassetto, Daniele, Somma, &

Bachmann, 2005). Pero estos esfuerzos no son suficientes comparados con el rápido avance de las actividades antrópicas que emplean grandes superficies del suelo para el desarrollo de actividades que por una razón u otra terminan siendo problemáticas ambientales que afectan los recursos naturales y la soberanía. Por ejemplo, la erosión del suelo por actividades antrópicas afecta a más de 60.000.000 ha en la Argentina y cada año se agregan otras 650.000 ha con distintos grados de erosión (Pérez Pardo, 2005). Asociada a este problema se encuentra la pérdida de la cobertura vegetal debida principalmente al desmonte para la ganadería y la agricultura, al sobrepastoreo y a la explotación forestal con destinos maderero y energético (Adámoli, 2005). La deforestación en la Argentina alcanza las 200.000 ha/año y se concentra en el Chaco Semiárido (130.000 ha/año), el Chaco húmedo (42.000 ha/año), la Selva Pedemontana de las Yungas (10.000 ha/año) y la Selva Paranaense (Gasparri & Grau, 2005). Además de estas actividades, otra problemática común y presente en el país es la expansión urbana. En la Pampa Ondulada, las urbanizaciones y su periurbano ocupan cerca de 674.000 ha, es decir, casi el 18% de lo que resultan ser los suelos más fértiles del país se encuentran tapados por cemento. En los últimos años, se ha acentuado la estructura que concentra recursos, población y servicios en los puertos, lo que ha derivado en la conformación de un conglomerado urbano casi continuo desde La Plata hasta Rosario, en una única "megaciudad".

Estas actividades generan problemas ambientales evidentes, que repercuten sobre la población humana, como son: la fragmentación, el reemplazo, degradación y contaminación de hábitats con la consecuente pérdida de biodiversidad (Montenegro, 2012; Navarrete, 2006), siendo esta última una preocupación no sólo a escalas local y regional sino también global (IUCN, 2017). Es evidente que las megaciudades son concentraciones de habitantes que generan residuos de todo tipo en grandes cantidades y que rara vez se manejan de manera responsable y sostenible.

La ciudad de La Plata y sus alrededores contiene, en una escala abordable, gran diversidad de actividades y usos de suelo típicos de la región pampeana, donde se ven reflejados los procesos de transformación. En sus inicios la región comprendía un área geográfica con gran prosperidad social y económica que con el tiempo ha ido transformándose en una megaciudad con evidentes falencias en el planeamiento territorial (Vapñarsky, 2000). Por esta razón, en la presente tesis se propone el área del Gran La Plata como sistema de estudio representativo de problemáticas asociadas al crecimiento urbano, identificando el avance de la frontera agrícola y desarrollo industrial (Hurtado, Giménez, & Cabral, 2006).

Se han seleccionado, para el área de estudio cuatro problemáticas ambientales evidentes, las cuales se enumeran y describen a continuación (Figura 1.1):

Agricultura: Es una de las actividades humanas que más afecta a los ecosistemas naturales (Lasier *et al.*, 2016; Lotz, 2009; Paruelo, Guerschman, & Verón, 2005). Una de las razones por las cuales este tipo de actividad antrópica es tan perjudicial para los ecosistemas es la utilización de grandes extensiones de tierra, lo que conlleva a la fragmentación y en algunos casos al reemplazo de hábitat y simplificación del ambiente.

Otra de las razones, estrechamente relacionada con la anterior, es el uso de agroquímicos de manera sostenida (Devine & Furlong, 2007; Grau & Aide, 2008; Lasier *et al.*, 2016; Suarez *et al.*, 2016). Estos son utilizados en todo el mundo para control de plagas agrícolas como insectos, malezas, roedores, etc. Además, el argumento de su extendido uso es que permiten mejorar y estabilizar el rendimiento de los cultivos y facilitan el almacenamiento de los productos permitiendo suministros de producción durante todo el año (Richardson, 1996).

Para abordar esta problemática se seleccionó una zona ubicada en El Cinturón Hortícola y Florícola Platense (CHFP) el cual está en las afueras de la ciudad de La Plata, es uno de los más importantes en nuestro país. Posee una gran superficie con un área de 2880 hectáreas, de las cuales 1888 ha (66%) son de campo abierto y 992 ha (34%) son de cultivo cubierto, siendo esta zona la más grande del país ocupada por invernaderos (Ringuelet, 2008). Presenta además una alta variedad de especies cultivadas, si bien el área de cultivo bajo cubierta es mucho mayor que la cultivada bajo invernadero, es en esta última donde se aplica el mayor empleo de productos agroquímicos (MAA, 2006).

Los cultivos más importantes en cuanto a inversión y rentabilidad son los de frutos como tomate, pimiento y berenjena, que se implantan principalmente bajo invernadero. El período de cultivo va desde agosto hasta abril /mayo y puede afirmarse que es durante el ciclo de estos cultivos donde se aplica el mayor volumen y diversidad de fitosanitarios (Cappello, Fortunato, Tangorra, & Vergara, 2013). Dichos compuestos, son liberados al ambiente, ingresan en los ecosistemas y llegan a los ambientes acuáticos en donde se reproducen los anfibios. La gran mayoría de los productores no cuenta con asesoramiento técnico, por lo tanto, obtiene las recomendaciones para aplicar los productos fitosanitarios en los comercios del rubro. En estos casos, para seleccionar el plaguicida suelen aplicar una lógica en la que prevalece el menor precio del producto, por lo que tienden a aplicar fitosanitarios de acción más generalizada (piretroides, organofosforados y carbamatos) y peores efectos ambientales (OPDS 2013). Para este trabajo se seleccionaron sitios ubicados en la planicie de inundación del arroyo “El Carnaval” el cual se encuentra inmerso en el CHFP. Dicho arroyo se encuentra al NorOeste de la ciudad de La Plata. Es típico de la región y corre de Oeste a Este. En general, esta zona presenta llanuras con poco relieve, el área de drenaje de 9,1 km² tiene 16 km de largo (M. Manassero, Camilión, & Ronco, 2004; A Ronco, Camilión, & Manassero, 2001). Además de estos sitios se seleccionaron dentro de la zona de influencia agrícola dos sitios más asociados con la presencia de anuros.

Urbanización: Para el estudio de las problemáticas asociadas al desarrollo urbano y periurbano consideramos aquellas derivadas del crecimiento de la ciudad, mayormente asociadas a la construcción de barrios, caminos y carreteras; sumado a las obras que generan el desvío de los cursos naturales de ríos y arroyos.

El desarrollo urbano, al igual que el avance de la frontera agrícola, trae aparejada la fragmentación y/o pérdida de una parte o de la totalidad del hábitat (R. Acosta, Mesones, & Núñez, 2005), agravando el proceso de impermeabilización de los suelos que se genera por la construcción. Esto altera la hidrodinámica de la región, ya que modifica las vías de

flujo de agua subterránea y superficial y dificulta la remediación (Sharp, 2010). Por otro lado, se incrementan las descargas pluviales que contienen una gran cantidad de componentes lixiviados del entorno urbano entre ellos metales e hidrocarburos policíclicos aromáticos provenientes de los vehículos. A su vez, en las áreas donde no hay cloacas, las descargas domiciliarias se realizan en zanjas. Estas aguas contienen alto contenido de detergentes fosforados e hidrocarburos, jabones y grasas (provenientes de productos de limpieza) y los aceites y grasas denominados FOG por sus siglas en inglés (Fats, oils, and grease) que son los subproductos de la cocción, restos de comida, grasas de carne, etc. (Husain *et al.*, 2014).

Otra fuente de contaminación relacionada con los asentamientos urbanos es la gran cantidad de basura producida que, al no ser adecuadamente manejada, termina en basurales a cielo abierto, algunos de ellos clandestinos, a partir de los cuales, los contaminantes llegan a los cuerpos de agua por lixiviación y escorrentía superficial. En los últimos años también se han detectado problemas ambientales asociados a nuevas sustancias denominadas contaminantes emergentes, definidos como “químicos nuevos”, sin estatus regulatorio y cuyo impacto en el ambiente y la salud humana está pobremente entendido (Deblonde, Cossu-Leguille, & Hartemann, 2011), como por ejemplo los microplásticos, productos de belleza y fármacos (Pazos, Bauer, & Gómez, 2018).

Como representación de esta problemática se seleccionaron para el estudio dos cuencas. La primera localizada en el arroyo “El Gato”. Dicho arroyo se encuentra al Oeste de la ciudad de La Plata. Tiene una superficie total de 12.412 ha. Su cauce principal recibe los desagües pluviales del casco urbano de la ciudad de La Plata, siendo los arroyos “Pérez” y “del Regimiento” sus afluentes más importantes. Al alcanzar la planicie costera es canalizado hasta su desembocadura en el Río de la Plata. En la cuenca alta predomina el uso frutihortícola intensivo, siendo la cuenca media la de mayor densidad poblacional, industrial y comercial. A lo largo de su recorrido se pueden observar las descargas pluviales, cloacales e industriales que vuelcan sobre el curso principal, situación que se agrava por los asentamientos poblacionales precarios que se encuentran en algunos sectores de su planicie de inundación (Curutchet, Grinberg, & Gutiérrez, 2012; Rimoldi, Peluso, Rossini, Ronco, & Demetrio, 2018; Ronco *et al.*, 2001). El segundo arroyo seleccionado es el “Maldonado”. Este arroyo nace en la zona interior a casi 25 m s.n.m con una extensión de 10 km y su cuenca abarca 36,22km² junto con sus tributarios tienen una marcada influencia sobre la morfología de la zona periurbana de la ciudad. Recibe los desechos de las casas ubicadas en sus cercanías (Bozzano, 2018). Además de estos sitios se seleccionaron dentro de la zona de influencia de Urbana un sitio más asociados con la presencia de anuros.

Industrialización: Para esta problemática se seleccionó la industria petroquímica, la cual involucra una gran cantidad de procesos capaces de producir impactos sobre el aire, el agua y el suelo (Olawoyin, Heidrich, Oyewole, Okareh, & McGlothlin, 2014). El emplazamiento de este tipo de industrias, debido a las dimensiones de sus obras, modifica la hidrodinámica del área a través de tuberías y acciones de relleno de tierra, provocando modificaciones en la química de las aguas superficiales y subterráneas (Santucci, Carol,

Borzi, & García, 2017). A pesar que sus procesos están sumamente monitoreados, controlados y regulados, como resultado de esta actividad se emiten gran cantidad y variedad de compuestos (mayormente hidrocarburos) al ambiente. La contaminación de aguas superficiales y subterráneas por actividad petroquímica puede darse también por fugas accidentales de aceite y otros productos químicos diferentes que incluyen grasas, fenoles, sulfuros, amoníaco, sólidos suspendidos, cianuros, nitrógeno, hidrocarburos y metales pesados por tuberías o tanques rotos (Côté, 1976). En las refinerías, el petróleo crudo se calienta para que sus componentes se puedan separar y recolectar, procesos en los cuales pueden ocurrir derrames accidentales y fugas lentas de gasolina y otros productos de tanques de almacenamiento y tuberías. Durante años de operación y gran cantidad de accidentes acumulados, el resultado es la liberación de grandes cantidades de hidrocarburos líquidos, que contaminan el suelo y el agua (Botkin & Keller, 2010).

Como representación de esta problemática se seleccionaron sitios localizados en los canales Este y Oeste de Berisso y Ensenada al Nor-este de la ciudad de La Plata. Ambos canales rodean el emplazamiento industrial que se encuentran dentro del área conocida como Polo Petroquímico de Ensenada-Berisso. Estos canales poseen 12 metros de ancho y dos de profundidad. Estos conforman un sistema casi simétrico, separados entre sí por 900 metros, que servían para la circulación del agua y su renovación, y para la navegación de cabotaje. El canal Oeste desemboca en el Río Santiago y éste a su vez en el Río de la Plata, además de estar al borde del predio de la destilería, parte de su recorrido atraviesa sectores de otras empresas. El canal Este, desemboca en el Gran Dock del Puerto de La Plata, que también se vincula con el Río Santiago (M. J. Manassero, Da Silva, Boff, & Hurtado, 2013; Palermo, Chaparro, Jurado, Bidegain, & Sinito, 2011) Además de estos sitios se seleccionaron dentro de la zona de influencia de la petroquímica tres sitios más asociados con la presencia de anuros

Descargas cloacales: Las cloacas son un sistema de tuberías subterráneas que transportan aguas residuales a las plantas de tratamiento. Estos sistemas de tuberías pueden ser sanitarias si transportan aguas residuales de los hogares, comerciales, industriales e institucionales o tuberías pluviales si transportan el escurrimiento del agua de calle o combinadas si transportan tanto aguas residuales sanitarias como de escorrentía pluviales (Hill, 2010). Los contaminantes ambientales que estos sistemas reciben son muy variados debido a las diversas fuentes de efluentes descargados en las alcantarillas. Estos incluyen productos de excreción humana con presencia de patógenos. El tipo de patógenos encontrados dependerá del estado de salud de la población, así como la presencia de hospitales, curtiembres, fábricas de procesamiento de carne y mataderos en la misma zona (Bruce & Davis, 1983). El grado de contaminación microbiológica y parasitológica de la población es por lo general una cualidad al considerar el riesgo. Entre los productos químicos que se vierten a las cloacas, se pueden mencionar los productos usados en el hogar entre los que se pueden nombrar los jabones y detergentes con presencia de surfactantes y gran variedad de aditivos. Otros contaminantes son los derivados del uso de combustibles para automóviles y lubricantes, los cuales se suman al ingreso de aguas pluviales por escorrentía de calles y autopistas, así como también efluentes de diferentes industrias. Además de estos contaminantes, las aguas residuales suelen tener

contaminantes emergentes, como ser, productos farmacéuticos los cuales causan efectos a bajas concentraciones, además una proporción considerable de estas sustancias producen productos metabólicos intermedios que pueden alcanzar los cuerpos de agua y causar efectos en la biota y los diferentes componentes de los ecosistemas. Además de los efectos directos que causan los contaminantes presentes en estas aguas también se pueden observar otros efectos en la calidad del agua, por ejemplo, si la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de las aguas residuales es demasiado grande para las aguas receptoras, puede producirse una reducción sustancial del oxígeno disuelto. El aumento de las concentraciones de nutrientes también ha demostrado tener graves efectos en los organismos y los ecosistemas, en relación a la eutrofización.

Por lo tanto, las descargas de aguas residuales en aguas superficiales representan una fuente importante de contaminantes a nivel mundial (Walker *et al.*, 2016) ya que alcanzan los cuerpos de agua con escaso o nulo tratamiento (Carrquiriborde & Somoza, 2015; Ternes, 1998; Walker *et al.*, 2016), y además pueden llegar a sistemas terrestres cuando el efluente de aguas residuales se utiliza para el riego o cuando se aplican lodos de aguas residuales como fertilizante de tierras agrícolas (Kinney *et al.*, 2006; Ternes *et al.*, 2004).

Como representación de esta problemática tomamos la descarga de efluentes cloacales y domésticos provenientes de las ciudades de La Plata, Berisso, Ensenada y alrededores, las cuales se realizan hacia el Río de La Plata. El conocido popularmente como “caño de la 66” recoge y lleva al Río de La Plata los desechos cloacales de la mayor parte de la Región, El mismo se encuentra roto desde hace más de cuatro décadas, justo en la costa. Los desechos que llegan a esta zona tienen un escaso o nulo tratamiento ya que solo existe una planta de pre-tratamiento que no siempre funciona.

La otra zona seleccionada para abordar esta problemática se ubica en la ciudad de Chascomús, sobre el arroyo Girado. En dicha ciudad los desechos cloacales son llevados a una planta depuradora la cual cuenta con 2 líneas, una más “antigua” y otra “nueva” inaugurada en el año 2011. La primera línea recibe 1/3 de los efluentes y la segunda 2/3 del total y, una vez depurados, los efluentes se vuelcan al arroyo Girado (sin uso recreativo) (DINAPREM, 2018). La planta se encuentra afectada en cuanto a su capacidad para depurar eficazmente los efluentes cloacales que llegan a la misma ya que ésta no cuenta con el equipamiento necesario en funcionamiento para lograr rendimientos de depuración que permitan cumplir las normas de vertido en condiciones normales (DINAPREM, 2018).

Referencia: En los estudios ecotoxicológicos, al igual que en toda investigación científica, es fundamental comparar los resultados de zonas estudiadas con los obtenidos a partir de mediciones realizadas en sitios de referencia, libres de contaminación, que nos permita contar con información de base necesaria para realizar comparaciones válidas como elementos para corroborar o refutar las hipótesis planteadas. Actualmente, encontrar sitios que no presenten alteraciones antrópicas es poco probable y difícil de corroborar.

Por tal motivo, para la realización de la presente tesis se seleccionaron como sitios de referencias áreas lo suficientemente alejadas de las problemáticas ambientales anteriormente nombradas, que no reciban influencia directa o al menos se encuentren fuera de lo que consideramos el área de influencia.

La primera corresponde a una zona ubicada al Este de la Ciudad de La Plata sobre la planicie de inundación del arroyo “El Pescado”. El arroyo es típico de la región y corre de Oeste a Este, atravesando la zona interior y la planicie costera posee 10 cauces menores (Sala, 1972), entre los que se puede mencionar al arroyo Cajaravilla, el arroyo Difuntos y el Arroyo del Sauce. La superficie total de su cuenca es de 356 km² y el valle de inundación alcanza en algunas partes los 500 m de ancho (Camilión, Manassero, Hurtado, & Ronco, 2003; A Ronco *et al.*, 2001). A los fines de esta investigación se seleccionaron dos sitios dentro de esta zona, el primero localizado en la región media de la planicie de inundación del arroyo “El Pescado” y el segundo a 3,37 km NE del arroyo. Dentro del primer sitio se trabajó en el establecimiento “Santa Ana”, el cual se localiza a mitad del recorrido del arroyo. Es un campo de aproximadamente 300 hectáreas, que posee 180 hectáreas destinadas al pastoreo de ganado bovino para tambo y en las zonas más bajas de su geografía, se forman charcas temporarias donde ocurre la reproducción de los anfibios que allí habitan. En el segundo sitio se trabajó en el campo denominado “Frisón”, de aproximadamente 11 ha destinadas al pastoreo de ganado bovino. Este campo comprende principalmente ambiente de pastizal y, en sus sectores topográficamente más bajos la acumulación de agua de lluvia forma una charca temporaria de 1 ha donde se reproducen las distintas poblaciones de anuros que habitan el ecosistema. Además, se seleccionaron dos sitios más, con la intención de contar con más sitios de referencia y aumentar el tamaño de muestra. Uno de ellos corresponde a una charca temporaria formada por agua de lluvia al costado de la ruta 20 y el otro es una laguna ubicada en la reserva ecológica de Punta Lara. Por último, se seleccionó un sitio de referencia ubicado en la zona costera del Río de la Plata a la altura de la ciudad de Magdalena, dicho sitio será utilizado para comparar los resultados de las descargas cloacales de La Plata ya que ambos sitios se localizan en la costa del Río de La Plata, presentando características similares entre sí, pero muy diferentes a los otros sistemas estudiados (que estarían situados en pastizales sin relación con el río)

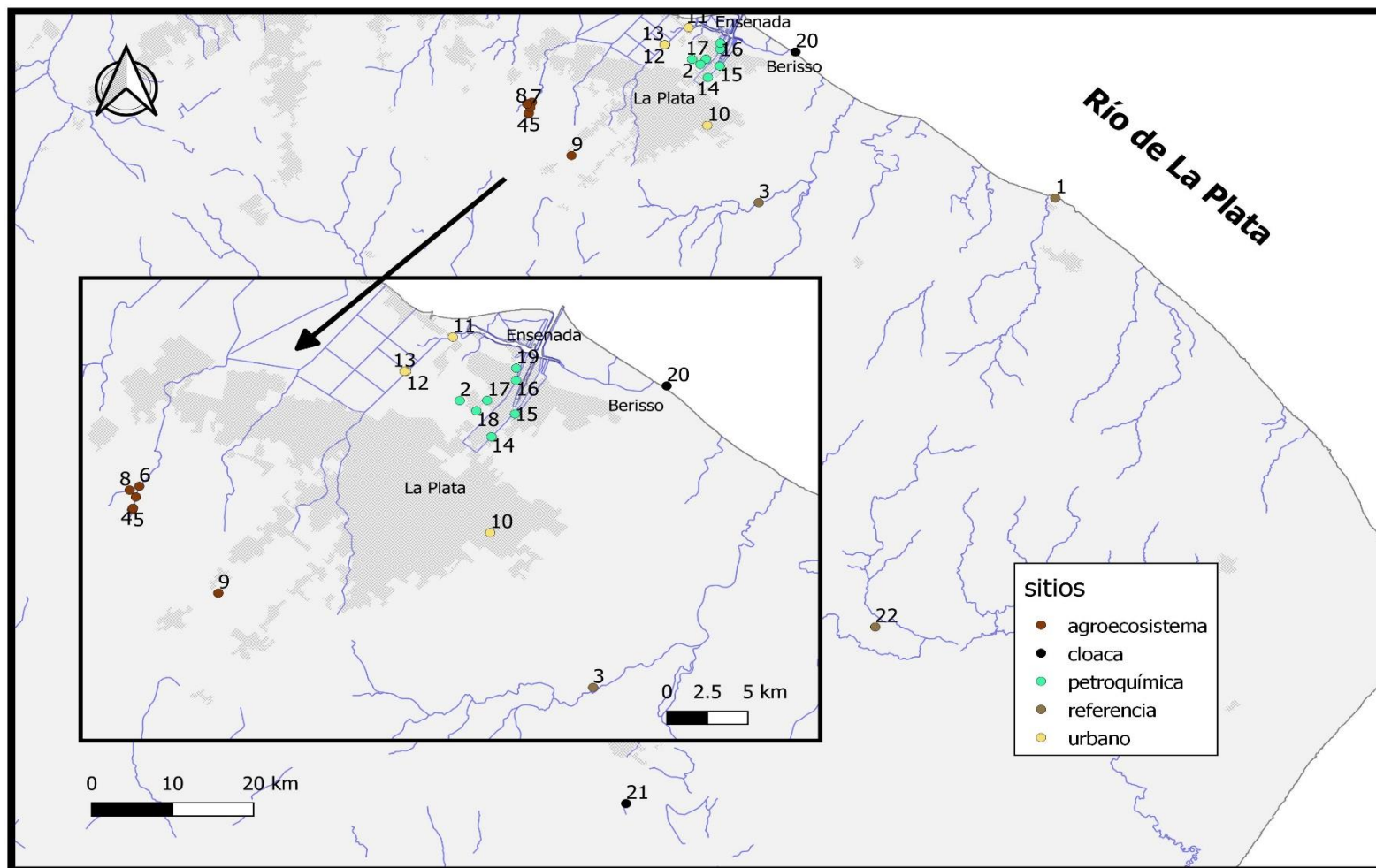


Figura 1.1. Área de estudio cuerpos de agua superficial.

Como se describió previamente, las problemáticas ambientales mencionadas se asocian a la liberación de un gran número de contaminantes al ambiente, muchos de los cuales alcanzan los cuerpos de agua superficial.

Mediante una búsqueda bibliográfica en Scopus, sobre los efectos que causan las problemáticas ambientales mencionadas, se estimó la información que existe actualmente de manera relativa y comparativa. Podemos ver que el mayor número de publicaciones a nivel mundial (73%) se centran en los efectos de la agricultura, siguiendo en orden decreciente la urbanización (17%), la petroquímica (6%) y las descargas cloacales (4%). Si solo consideramos trabajos en los cuales utilizan anfibios como bioindicadores se sigue viendo la misma tendencia en cuanto a la cantidad de publicaciones de cada problemática las cuales se centran en los efectos de la agricultura (67%), siguiendo en orden descendiente la urbanización (31%), la petroquímica (1%) y las descargas cloacales (1%) y si restringimos la búsqueda a Argentina solo aparecen trabajos que abordan las problemáticas de la agricultura (74%) y la urbanización (16%). Esto nos da un panorama de la desigualdad que existe en cuanto a la bibliografía de cada una de las problemáticas resaltando la escasez y necesidad de realizar trabajos enfocados en las problemáticas menos estudiadas.

1.1.3 Especies de estudio

Las especies seleccionadas para la realización del presente trabajo son *Rhinella arenarum* y *Boana pulchella*. Ambas habitan la región pampeana de Argentina y son abundantes y de amplia distribución en nuestro país y países limítrofes. En cuanto al estado de conservación son consideradas de "menor preocupación" o "no amenazadas" según las clasificaciones de la *International Union for Conservation of Nature* o IUCN (2019) y de la Asociación Herpetológica Argentina (Vaira *et al.*, 2012).

Vale aclarar que *R. arenarum* es una especie ampliamente estudiada a nivel local y en el contexto de la ecotoxicología es considerada modelo de estudio a pesar de ser considerada una especie tolerante a diferentes contaminantes (Ruiz de Arcaute *et al.*, 2012; Suarez *et al.*, 2016). En este sentido y considerando la gran diversidad de nuestra región actualmente, herpetólogos y ecotoxicólogos locales reconocen, la necesidad de generar información sobre la biología, ecología y específicamente la sensibilidad de otras especies representativas de la región pampeana para ser utilizadas como modelo de estudio en ecotoxicología, o como especies indicadoras de la calidad ambiental de ecosistemas acuáticos, motivo por el cual se incluye en este trabajo a la especie *Boana pulchella*.

***Rhinella arenarum* (Hensel, 1867):** (Figura 1.2), vulgarmente conocido como sapo común sudamericano, es una especie de anfibio anuro que se distribuye ampliamente en Sudamérica, y es común en ambientes periurbanos. Mide aproximadamente 15 cm de longitud hocico-cloaca, presentando el dorso de color marrón verdoso con verrugas y el vientre de color claro. En invierno se ocultan en refugios naturales o artificiales, incluso bajo tierra. Los grandes cuerpos grasos asociados a sus gónadas son utilizados para cubrir sus limitadas necesidades metabólicas durante la hibernación. Se alimentan de insectos, lombrices y crustáceos terrestres. La reproducción ocurre durante la primavera y

principios del verano, lo cual coincide con la estación de lluvias. Los huevos, pequeños y oscuros, son expulsados en cordones gelatinosos mientras son fecundados externamente por los machos (Ceí, 1980; Fernández, 1927; Gallardo, 1987). Un promedio de 40000 huevos es frecuente para la puesta de una hembra madura en una temporada reproductiva (Natale, 2006). Las larvas eclosionan entre el 2° y 3° día, entre los estadios 19-20 de desarrollo (Gosner, 1960), con un tamaño de 3 mm aproximadamente. Luego de la eclosión permanecen adheridas a la vegetación durante los primeros ocho días momento en el que alcanzan el estadio 25 de desarrollo (Gosner, 1990). Son larvas de hábitos bentónicos lo que favorece la interacción con los sedimentos (Fernandez, 1927; Ceí, 1980; Gallardo, 1987) *Rhinella arenarum* es una especie ampliamente estudiada a nivel local. En lo que respecta a su desarrollo ontogenético y su morfología son numerosos los trabajos que abordan este tema (Castañe, Salibian, Zylbersztein, & Herkovits, 1987; Del Conte & Sirlin, 1952; Echeverría, 1990; Filipello & Echeverría, 1990; Herkovits, 1977). También se han desarrollado estudios de la ecología reproductiva (C. L. Bionda, Lajmanovich, Salas, Martino, & di Tada, 2011). Otros estudios, han utilizado a la especie como modelo para evaluar el crecimiento y desarrollo (C. Bionda *et al.*, 2015). En lo que concierne a los estudios ecotoxicológicos son numerosos los trabajos realizados con *R. arenarum*, mencionamos algunos de ellos que han evaluado puntos finales que van desde la mortalidad hasta biomarcadores individuales, bioquímicos y citogenéticos en relación con la exposición a plaguicidas (Aronzon, Marino, Ronco, & Pérez Coll, 2014; Brodeur, Poliserpi, & Sánchez, 2014; Candioti *et al.*, 2010; Ferrari *et al.*, 2008; Junges *et al.*, 2013; Lascano, Ferrari, & Venturino, 2011; Sotomayor, Lascano, de D'Angelo, & Venturino, 2012; Svartz, Herkovits, & Pérez-Coll, 2012; Svartz, Aronzon, & Coll, 2016; Svartz, J. Herkovits, & Pérez-Coll, 2012). Además, se han realizado varios estudios de laboratorio evaluando los efectos adversos de metales pesados (Ferrari & Salibian, 1999; Herkovits & Pérez Coll, 1993; Herkovits & Pérez-Coll, 1999; Hojman, Meichtry, Litter, & Coll, 2015; Pérez-Coll, Herkovits, & Salibian, 1985; Pérez-Coll *et al.*, 1988), así como también estudios a campo (Babini *et al.*, 2015; Bionda *et al.*, 2013).

***Boana pulchella* (Duméril y Bibron 1841):** (Figura 1.2) Posee varios nombres comunes como: Ranita de Zarzal, Rana Trepadora Común (en inglés Montevideo Treefrog). Es una especie arborícola de la familia Hylidae que se distribuye en Uruguay, Praguay, Sur de Brasil y parte de Argentina, siendo una especie abundante en la región pampeana de Argentina (Ceí, 1980). Su tamaño va desde 32–46 mm en machos y de 41–48 mm en hembras. Presentan un color dorsal variable, crema, grisáceo o verde, tanto homogéneo como reticulado y con capacidad de realizar cambios de coloración en un mismo individuo. Presenta coloración flash en la zona inguinal, axial y femoral interna siendo el vientre amarillo- blancuzco. Se alimenta de moscas, pequeñas langostas, grillos y polillas entre otras cosas. Se reproducen al menos dos veces por año (fines de otoño-principio de invierno y fines de verano principios de otoño) incluso con bajas temperaturas. Las puestas están formadas por 300 a 3.000 huevos agrupados en una masa irregular adheridos a la vegetación sumergida dentro de los 10 cm superficiales de la columna de agua. Las larvas eclosionan entre los dos y cuatro primeros días, entre los estadios 19-21 de desarrollo (Gosner 1990), con un tamaño aproximado de 3 mm. Luego

de su eclosión permanecen adheridas a la vegetación hasta llegar al estadio 25 (Gosner 1990) (5- 7 días aproximadamente). Son larvas muy nadadoras, con hábitos nectónicos-bentónicos lo que favorece la interacción con los sedimentos (Cei 1980; Natale, 2006).

Varios autores han trabajado utilizando esta especie como modelo, por lo cual se han realizado importantes aportes en varios aspectos de la biología de las larvas con estudios que abarcan el desarrollo y morfología (G. N. Acosta, Baldo, Kolenc, Borteiro, & Candiotti, 2017; Alcalde, 2005; Hoyos, Sánchez-Villagra, Carlini, & Mitgutsch, 2012; A. I. Kehr, 1987; Kolenc *et al.*, 2008). Otros estudios han utilizado a la especie como modelo para evaluar los efectos de la densidad larval sobre el crecimiento, desarrollo y la variabilidad que presentan (A. Kehr, 1989; A. I. Kehr, 1987; Ziegler, Berazategui, & Arim, 2014). Finalmente, un menor número de investigaciones, utilizando a *B. pulchella*, han profundizado sobre los mecanismos moleculares para mitigar el daño genético por exposición a UV en larvas (Schuch *et al.*, 2015) y se han descrito las anomalías morfológicas presentes en adultos (Peltzer *et al.*, 2011; Perí & Williams, 1988) y hasta múltiples amplexos durante la reproducción (Lombardo, Carreira, & Maneyro, 2016).

En lo que concierne a los estudios ecotoxicológicos en *B. pulchella*, algunos de ellos han demostrado que la especie puede ser afectada por distintos estresores ambientales en diversas etapas de su desarrollo, principalmente mediante la evaluación de parámetros poblacionales y puntos finales que van desde la mortalidad hasta biomarcadores individuales, bioquímicos y citogenéticos en los ambientes naturales alterados por la actividad agrícola y donde se aplican diferentes tipos de pesticidas (Agostini *et al.*, 2013; Agostini *et al.*, 2009; Agostini, Saibene, Roesler, & Bilenca, 2016; Brodeur *et al.*, 2011; Brodeur *et al.*, 2009; J C. Brodeur *et al.*, 2012; Lopez, Scarabotti, & Ghirardi, 2015; Moreira, Moura, & Maltchik, 2016; Sanchez *et al.*, 2013; Suarez *et al.*, 2016). Además, se han realizado varios estudios de laboratorio evaluando los efectos adversos de metales pesados (Natale *et al.*, 2006; Natale *et al.*, 2000), insecticidas en larvas (Agostini *et al.*, 2009, 2010; De Arcaute *et al.*, 2014a; Junges, Lajmanovich, Peltzer, Attademo, & Bassó, 2010; Natale *et al.*, 2018; Pérez-Iglesias, Soloneski, Nikoloff, Natale, & Larramendy, 2015; Pérez-Iglesias, Natale, Soloneski, & Larramendy, 2018; Pérez-Iglesias, Ruiz de Arcaute, Natale, Soloneski, & Larramendy, 2017; Pérez-Iglesias *et al.*, 2014) y herbicidas sobre esta especie (Peltzer *et al.*, 2013).



Rhinella arenarum



Boana pulchella

Figura 1.2. Especies de estudio.

1.1.4 Inducción artificial de la reproducción

La reproducción de anuros en cautiverio no es fácil de lograr, esto se debe en mayor medida a las condiciones específicas que requieren cada especie. Una de las técnicas que ha sido más utilizada es la administración de una hormona o la combinación de varias: la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Licht & Porter, 1987), una forma sintética de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH) (Licht, 1979), o gonadotropina coriónica humana (HCG) (Herkovits & Pérez-Coll, 1991; Licht, 1979). El método AMPHIPLEX (Trudeau *et al.*, 2010) se probó por primera vez en Argentina, trabajando en colaboración con un grupo de investigadores de la Universidad de Ottawa a cargo del Dr. Trudeau. La primera especie en la cual se probó el método fue en *Ceratophrys ornata* y luego se aplicó a otras especies de anfibios autóctonos (*C. cranwelli* y *Odontophrynus americanus*), demostrando su aplicabilidad para la cría en cautividad de especies pertenecientes a diferentes familias de anuros (Salgado Costa, 2016; Salgado Costa *et al.*, 2018). El método se basa en la inyección combinada de un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y un antagonista de la dopamina. Si bien es sabido que para anfibios tanto la GnRH como los agonistas de la GnRH pueden estimular la liberación de hormona luteinizante (LH) por parte de la glándula pituitaria (Licht *et al.*, 1983), el desove puede no resultar eficaz si el tratamiento no es acompañado con otras hormonas o agentes neuroactivos (Browne, Seratt, Vance, & Kouba, 2006; Kouba, Vance, Milam, & Carr, 2012) Esto indica la existencia de un mecanismo neuroendocrino inhibitorio que controla la liberación excesiva de LH, la cual es necesaria para la ovulación y el desove. Al momento de emplear una especie modelo o desarrollar métodos estandarizados para la experimentación, es muy importante garantizar la disponibilidad de organismos, por lo que lograr su reproducción en cautiverio es un punto clave que requiere atención.

En el presente trabajo de tesis, se propuso recabar información sobre aspectos reproductivos de las especies, de modo que permita realizar la inducción de la reproducción por medio de AMPHIPLEX de manera exitosa. Brindando así bases más sólidas al momento de argumentar o fundamentar la propuesta de emplear las especies como modelo de estudio.

Hipótesis

1. Los sitios seleccionados están influenciados por las problemáticas ambientales evaluadas presentando características singulares.
2. Los diferentes sitios de estudio presentan una riqueza específica similar.
3. La inducción artificial de la reproducción por el método AMPHIPLEX resulta exitoso para la especie *B. pulchella*.

Objetivos

1. Realizar una descripción del área de estudio, detallando las características meteorológicas del periodo estudiado y las características limnológicas y fisicoquímicas del agua y sedimentos en cada sitio de estudio.
2. Realizar un relevamiento de la anfibiafauna en los sitios de estudio.
3. Obtener información sobre el estado reproductivo de individuos de *B. pulchella* que habitan en sitios reproductivos de referencia, útil para realizar pruebas de inducción artificial AMPHIPLEX.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Selección de los sitios de muestreo

Los sitios de estudio fueron seleccionados a partir de prospecciones y muestreos previos realizados en La Plata y sus alrededores. Una vez identificadas las problemáticas ambientales relevantes para el estudio (descriptas en la introducción del capítulo) se realizaron recorridos en las diferentes zonas y se seleccionaron los sitios siguiendo los siguientes criterios.

1-Uso del suelo: Se identificaron sitios con diferentes usos del suelo y grado de desarrollo dentro de las problemáticas seleccionadas previamente.

2- Grado de contaminación: Se seleccionaron sitios que contarán con información previa publicada, que indicará evidencias de contaminación específica de cada actividad, e incluso del grado de contaminación, considerando como preferencia los sitios que actualmente estén siendo estudiados por otros investigadores de nuestra universidad.

3- Factibilidad y Accesibilidad: Se consideraron las distancias, la accesibilidad a los sitios y los permisos de los propietarios, prefiriendo sitios en áreas cercanas, que presentaran fácil acceso, con caminos en buen estado (calles asfaltadas que permitan el acceso durante y/o luego de lluvias) y en los cuales se contará con los permisos y autorizaciones por parte del dueño particular, o de instituciones gubernamentales.

4- Calificación de los ambientes: Se seleccionaron charcas o cuerpos de agua que contengan hábitats con características necesarias para la reproducción de las especies de anuros de la región y en particular los requerimientos de hábitat de las especies de estudio.

1.2.2 Caracterización climática del periodo estudiado (2015-2018)

Para el análisis de las variaciones climáticas del periodo de estudio (2015-2018) se utilizaron datos del servicio meteorológico nacional (<https://www.smn.gob.ar/descarga-de-datos>) correspondientes a temperatura (°C), humedad relativa (%), presión (hPa), viento (Km/h) y precipitaciones (mm) medias. Con estos datos se construyeron

climatogramas y se compararon con datos climatológicos del periodo 1981-2010, considerados como normales por el Servicio Meteorológico Nacional. Esta información se empleó para interpretar los resultados de los muestreos de anfibios.

1.2.3 Caracterización fisicoquímica del agua y sedimento

Se realizaron caracterizaciones de la calidad del agua de los diferentes sitios, registrándose *in-situ* la temperatura, conductividad, oxígeno disuelto y pH utilizando una sonda multiparamétrica modelo WA-2017SD. Además, se tomaron muestras de agua por triplicado en botellas de vidrio color caramelo y muestras de 200 gr de sedimento compuestas en bolsas de polipropileno para análisis químico en laboratorio. Para las determinaciones fisicoquímicas realizadas en laboratorio se siguieron los métodos analíticos normalizados, descritos en (APHA, 1998): fósforo total (4500-PC), fósforo reactivo soluble (4500-PC), nitritos (4500-NO₂-B), nitratos (4500-NO₃-B), nitrógeno amoniacal (4500-NH₃F), sólidos totales (2540B ST), sólidos disueltos (2540-C), sólidos suspendidos (2540-D). DQO (EPA, 410.4), dureza (2340-C), alcalinidad (2320) para la matriz agua. Para la matriz sedimento se determinó la materia orgánica. Complementariamente se confeccionó una base de datos producto de una exhaustiva revisión bibliográfica para constatar la presencia de contaminantes ambientales (pesticidas- metales pesados- hidrocarburos- FOG- detergentes-contaminantes emergentes) en los diferentes sitios de estudio.

1.2.4 Relevamiento de anfibios

Se realizaron relevamientos de anfibios para constatar la presencia y reproducción de las diferentes especies en los sitios de estudio. Para ello se realizaron salidas al campo nocturnas y diurnas. El método empleado para la identificación de las especies presentes fue el de muestreo auditivo (Zimmerman, 1994). Este método consiste en la audición de las vocalizaciones de anfibios. Durante las inspecciones en cada uno de los sitios se registró durante 60 minutos la presencia de las especies que cantaban (Heyer, Donnelly, Foster, & Mcdiarmid, 2014).

Con la finalidad de probar y poner a punto el método AMPHIPLEX para lograr la reproducción de *Boana pulchella* en cautiverio, se realizaron muestreos detallados (con mayor esfuerzo de muestreo en función del tamaño del área recorrida) en uno de los sitios de referencia. Para ello se aplicaron dos técnicas propuestas por (Heyer *et al.*, 2014), las técnicas de encuentros visuales y la técnica de transectas. Para la técnica de encuentros visuales se realizaron caminatas por el sitio de estudio (generalmente alrededor de la charca) por un periodo de 30 minutos. Para el muestreo por transectas se trazaron 3 transectas imaginarias de 250 m de longitud. En la Figura 1.3 se muestra el diseño de muestreo en el campo que rodea el sitio reproductivo seleccionado para el estudio.



Figura 1.3. Transectas realizadas en el sitio de referencia.

A cada uno de los individuos de *B. pulchella* encontrados mediante estas técnicas se les determinó el sexo y se tomaron medidas corporales con la intención de estimar su estado reproductivo. Con calibre de 0,01 mm se midió *in situ* la longitud hocico- cloaca, y en las hembras el ancho de vientre y con balanza analítica de precisión 0,01 g se determinó el peso. Los individuos, una vez pesados y medidos fueron fotografiados y finalmente liberados, a excepción de 30 individuos (capturados 10 por año) que fueron colectados, transportados al laboratorio y mantenidos en un terrario confeccionado siguiendo las recomendaciones para individuos de la familia Hylidae (ASoIaH, 2004; Mattison, 1987; Nace, 1977; Staniszewski, 1995) con la finalidad de ser utilizados como adultos reproductivos. Previo a la recolección de los individuos se solicitaron los permisos correspondientes a Dirección de Flora y Fauna de la provincia de Buenos Aires (código 22500-41820/17 disposición 73; código-2019-37803203).

Los ejemplares adultos de *B. pulchella* mantenidos en cautiverio fueron alimentados dos veces por semana con larvas de *Tenebrio molitor*, y variedades de dípteros adultos e isópodos (Antoniazzi, López, Duré, & Falico, 2013; Da Rosa, Canavero, Maneyro, & Camargo, 2011). Para evaluar la condición de bienestar en cautiverio, se realizaron prospecciones generales de los individuos cada 30 días y se tomaron medidas de los individuos (las mismas que en el campo) para conocer su estado de condición. Los procedimientos de cría y mantenimiento de anfibios en cautiverio fueron evaluados debidamente por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (Número de protocolo: 023-22-15).

1.2.5 Inducción de la reproducción de *Boana pulchella*

Para realizar las pruebas de inducción artificial de la reproducción en laboratorio se calculó el índice de condición corporal (K) pre reproductivo a partir de datos previos

obtenidos por el grupo de trabajo, los que se complementaron con datos obtenidos en el presente trabajo. Estos datos fueron obtenidos de hembras colectadas en amplexo en el campo a las cuales se les tomó las medidas antes y después de desovar. Finalmente, de las hembras mantenidas en el laboratorio se seleccionaron aquellas que presentaran un índice K entre 0,04 y 0,07 consideradas como óptimas para lograr la reproducción.

Con las hembras seleccionadas se realizaron experimentos de inducción, tanto machos como hembras, fueron inyectados intraperitonealmente con 0,4 µg/g de peso corporal del agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (des-Gly10, D-Ala6, Pro-NHEt9-GnRH, marca Sigma-Aldrich®) más 10 µg/g de peso corporal del antagonista de la dopamina (hidrocloruro de metoclopramida, marca Sigma-Aldrich®) disuelto en 0,7% NaCl. La solución fue preparada e inyectada en el mismo momento, habiéndose inyectado 1 µl/g de peso corporal de individuos maduros sexualmente siguiendo las recomendaciones de Trudeau *et al* (2010).

A continuación, se detalla cada experimento de inducción y cada pareja:

Experimento I: El 12 de Abril de 2018, se realizó el primer experimento para el cual se emplearon 10 parejas de adultos de *B. pulchella*. El peso, la longitud hocico-cloaca y la dosis administrada se muestran en la Tabla 1.1. Se indujeron 5 parejas y las restantes 5 se utilizaron como control inyectándoles solución fisiológica. Posteriormente todas las parejas fueron acondicionadas en frascos de 3 L con dos porciones de juncos (*Schoenoplectus californicus*) para la adherencia de las ovas y 1,5 L de agua, se mantuvieron en un cuarto con fotoperiodo 18/6 y a 25 °C (Figura 1.4 A).

Tabla 1.1- Parejas de *B. pulchella* inducidas para probar inducción artificial

Inducidas					Control				
Pareja	Sexo	Peso (g)	LT (mm)	Dosis (µl)	Pareja	Sexo	Peso (g)	LT (mm)	Dosis (µl)
1	Macho	3,08	43,2	30	6	Macho	3,88	43,1	39
	Hembra	5,65	47	56		Hembra	5,56	50,5	55
2	Macho	3,74	40,7	37	7	Macho	4,8	47,4	48
	Hembra	5,09	53,9	51		Hembra	8,22	57,9	82
3	Macho	4,04	44,5	40	8	Macho	4,03	46,1	40
	Hembra	4,66	42,7	46		Hembra	7,06	55,1	70
4	Macho	4,82	46,8	48	9	Macho	3,13	51,9	31
	Hembra	8,22	51,1	82		Hembra	5,18	46,1	52
5	Macho	4,73	41,9	47	10	Macho	3,28	37,3	33
	Hembra	4,06	43,7	40		Hembra	4,37	51,9	31

Experimento II: El 21 de Junio de 2018, se indujeron 10 individuos (5 hembras y 5 machos) adultos de *B. pulchella*. El peso, la longitud hocico-cloaca y la dosis administrada se muestran en la Tabla 1.2. Los adultos fueron acondicionados en una pecera de 80cm de largo, 50cm de alto y 20cm de profundidad, con plantas acuáticas para

la adherencia de las ovas, 2,5 L de agua y 10 L de suelo. Durante las primeras 24 horas se mantuvo la temperatura a 25 °C luego se bajó a 16°C. (Figura 1.4B).

Tabla 1.2. Parejas de *B. pulchella* inducidas para probar inducción artificial

Sexo	Inducidas		
	Peso (g)	LT (mm)	Dosis (µl.)
Hembra	5,55	51,9	55
Hembra	9,7	57,9	97
Hembra	7,4	50,5	74
Hembra	6,21	51,1	62
Hembra	7,36	55,1	73
Macho	4,46	47,4	45
Macho	5,74	42,7	57
Macho	3,46	42,4	35
Macho	4	43,1	40
Macho	4,99	46,1	50



Figura 1.4. Inducción de *B. pulchella*. A- Frascos utilizados en el primer experimento de inducción. B- Pecera utilizada en el segundo experimento de inducción.

Luego de cada inducción, se monitoreó diariamente a los individuos inyectados durante tres días, en busca de signos vinculados con la respuesta a la inducción, como emisión de cantos en machos y formación de amplexos y presencia de puestas.

1.2.6 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en las diferentes actividades realizadas, fueron analizados mediante estadística descriptiva, con el objetivo de conocer la distribución de los datos, y describir su comportamiento. Se construyeron tablas y gráficos para su presentación. Se realizaron pruebas de ANOVA con prueba posteriori de Dunnet para determinar diferencias significativas entre los sitios para el conjunto de parámetros analizados en los sitios ($\alpha=0,05$) y se realizó un análisis de componentes principales para describir el comportamiento del conjunto de parámetros analizados y conocer el grado de relación entre la totalidad de las variables. Mediante análisis de regresión y correlación entre datos

morfométricos se calcularon índices de condición corporal para seleccionar ranas en buen estado reproductivo.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Descripción de los sitios

De un total de 35 sitios visitados, se seleccionaron, siguiendo los criterios nombrados anteriormente, 28 sitios para la realización de la tesis en el marco propuesto por el proyecto PICT 2015-3137. La ubicación de estos sitios puede verse en la Figura 1.1. En la Tabla 1.3 se muestra la lista de los sitios seleccionados según la problemática junto con sus coordenadas.

Tabla 1.3. Sitios seleccionados para el estudio.

Problemáticas	Sitios	Latitud	Longitud
REFERENCIA	1-Control Atalaya	-35.015811°	-57.527810°
	2-Control Frisón	-35.151304°	-57.389143°
	3-Control Molfesa	-35.020621°	-57.857203°
	22-Control Ruta 20	-35.265016°	-57.435017°
	23-Control Reserva.	-34.51220°	-58.35989°
AGRICOLA	4-Agroecosistema 1	-34.930104°	-58.112883°
	5-Agroecosistema 2	-34.929245°	-58.112493°
	6-Agroecosistema 3	-34.918093°	-58.108998°
	7-Agroecosistema 4	-34.923533°	-58.110900°
	8-Agroecosistema 5	-34.920060°	-58.114377°
	9-Agroecosistema 6	-34.972538°	-58.065182°
	24- Agroecosistema charca 2	-34.9229250	-58.112498°
	25- Agroecosistema charca 5	-35.5732°	-58.63756°
	26- Agroecosistema Remes	-35.13206°	-57.594302°
	URBANO	10-Urbano villa Elvira	-34.941771°
11-Urbano Zanjón		-34.841965°	-57.935058°
12-Urbano Gato		-34.859528°	-57.960984°
13-Urbano Ceamce		-34.859483°	-57.961891°
27-Urbano Regatas		-34.848730°	-57.926666°
INDUSTRIAL	14-Petroqca. Canal Este 1	-34.892868°	-57.913604°
	15-Petroqca. Canal Este 2	-34.881223°	-57.900535°
	16-Petroqca. Canal Oeste	-34.863992°	-57.899972°
	17-Petroqca. Fosforito	-34.874295°	-57.915926°
	18- Petroqca. Simpson	-34.879608°	-57.922008°
	19-Petroqca. Arenal	-34.857839°	-57.899883°
	28-Petroqca. GESA	-35.522789	-57.555240'
CLOACAS	20-Cloaca Berisso	-34.866869°	-57.816384°
	21-Cloaca Chascomús	-35.630890°	-58.004613°

Como **referencia** se seleccionaron cinco sitios (Figura 1.5). El **sitio 1** se ubica en la costa del Río de la Plata a la altura del pueblo de Atalaya. El acceso al mismo se dificulta en los días de lluvia y de crecidas del río ya que la calle que lleva al sitio no se encuentra asfaltada. El sitio se encuentra totalmente influenciado por el río presentando los ambientes típicos costeros (pajonales, juncuales, pastizales). Los sitios 2 y 3 se encuentran en la planicie de inundación del arroyo el pescado a 11 y 14 km, respectivamente del centro de la ciudad de La Plata. El **sitio 2** se ubica en un campo privado sobre avenida 7 a la altura de 523. Esto le confiere un fácil acceso, además de contar con los permisos por parte del dueño. Como se dijo en la introducción, en los sectores topográficamente más bajos del campo, y favorecido por un bloqueo artificial del escurriendo natural del agua se forma un endicamiento con la consecuente acumulación de agua de lluvia forma una charca semi permanente con una superficie aproximada de 1 ha. La vegetación predominante es de pastizal, con pocos árboles en su mayoría *Celtis tala* y abundantes plantas acuáticas como *Potamogeton* sp, *Azolla* sp. El **sitio 3** se ubica en un campo privado a 100 m del puente que conduce a la localidad de Ignacio Correa. El acceso es fácil ya que la calle principal está asfaltada y además se cuenta con los permisos por parte de los dueños del campo. Se trabajó en el establecimiento “Santa Ana”, el cual se localiza a mitad del recorrido del arroyo. Como se dijo en la introducción en las zonas más bajas se forma una charca de 1ha aproximadamente donde predominan los juncos (*Schoenoplectus californicus*), y en menor proporción *Typha latifolia*. Las zonas más profundas presentan vegetación acuática tupida (*Potamogeton* sp, *Lemna* sp, *Sagitaria* sp y *Azolla* sp). Rodeando esta charca existe un pajonal de cardas *Eryngium* sp. El **sitio 22** se ubica al costado de la Ruta 20 en a la altura del Arroyo Samborombón. El acceso es fácil. Al costado de dicha ruta se forman charcas temporarias con agua de lluvia y del desborde del arroyo de aproximadamente de 1ha donde predominan *Potamogeton* sp, *Lemna* sp, *Sagitaria* sp y *Azolla* sp. El **sitio 23** se ubica en la reserva ecológica de Punta Lara. El acceso al mismo no es fácil, pero se cuenta con los permisos necesarios. Este sitio se caracteriza por ser un ambiente léntico formado con agua proveniente de lluvia y de los arroyos cercanos.



1- Atalaya



2- Frisón



3- Molfesa



22- Ruta 20



23- Reserva

Figura 1.5. Sitios de estudio considerados como referencia.

Para evaluar la problemática **agrícola** se seleccionaron 9 sitios (Figura 1.6). Los sitios 4-5-6-7-8-24 y 25 se encuentran ubicados en la planicie de inundación del arroyo “El Carnaval” e inmersos en el CFHP. Para acceder a los mismos se obtuvo previamente la autorización del dueño de los campos. En cuanto a la facilidad de llegada, el acceso a estos sitios se dificulta en periodos de lluvia ya que las calles 448 y 178 no se encuentran asfaltadas.

El arroyo atraviesa desde su nacimiento un área con gran cantidad de invernaderos llegando al **sitio 4** que se caracteriza por ser un sector del arroyo que posee 6 m de ancho y abundante vegetación con dominio de *T. latifolia* y *Juncus sp* en los márgenes y *Potamogeton sp*, *Lemna sp*, *Sagitaria sp* y *Azolla sp* en la superficie. El arroyo continua su curso llegando a un predio donde se realizan cultivos de tipos intensivos, el **sitio 5** se ubica en dicho predio, se caracteriza por ser un ambiente más bien léntico, que recibe agua del arroyo y del lavado de los camiones y verduras que llegan al sitio mediante una zanja de desagüe. En los márgenes se observa gran cantidad de *T. latifolia* y *Azolla sp* en la superficie. A los márgenes del arroyo, en este sector se encuentra el **sitio 24** el cual consiste en una charca temporaria de 611 m² que se encuentra inmersa en el cultivo. El **sitio 7** se encuentra aguas abajo del anterior, en un campo de cultivo intensivo,

principalmente de soja. El ancho del arroyo en este sector es de 3m y presenta gran cantidad de *T. latifolia* en sus márgenes. El **sitio 8** se ubica en el mismo predio y a la misma altura que el sitio 6 pero más al norte, en un brazo del arroyo que corre paralelo al anteriormente descrito. En este sitio el arroyo presenta un ancho de 4m y no presenta *T. latifolia* en los márgenes, por lo tanto, los cultivos se extienden casi hasta el margen del arroyo lo que ocasiona que la vegetación presente sea la del cultivo y que las fumigaciones se realicen prácticamente sobre el arroyo. El **sitio 24** corresponde a charcas temporarias que se forman en la unión de ambos brazos del arroyo. El **sitio 6** se ubica en la confluencia de ambos brazos, en este sector el arroyo tiene un ancho de 3m y presenta características similares a las del sitio 7, con abundante vegetación en los márgenes con dominio de *T. latifolia*. El **sitio 9** se ubica en una zanja de desagüe al costado de la ruta provincial 36 a metro de la calle 526. Este sitio se caracteriza por ser de ambiente léntico, con agua que proviene principalmente de lluvia y del escurrimiento de los invernaderos que se ubican en esa manzana. El ancho de la zanja en este sector es de 10 m y presenta plantas acuáticas como *Potamogeton sp*, *Lemna sp*, *Sagitaria sp* y *Azolla sp*. Por último el **sitio 26** está ubicado al costado de la ruta 36 y calle 89 es de fácil acceso ya que la calle principal se encuentra asfaltada. Consiste en un ambiente lenticó que se corresponde con un brazo del arroyo el Pescado en un sector de cultivo intensivo.



4- Agroecosistema



5- Agroecosistema



6- Agroecosistema



7- Agroecosistema



8- Agroecosistema



9- Agroecosistema



24- Agroecosistema



25- Agroecosistema



26- Agroecosistema

Figura 1.6. Sitios de estudio seleccionados para el estudio de la problemática agrícola.

Para la problemática **urbana** se seleccionaron cinco sitios (Figura 1.7). El **sitio 10** se ubica sobre uno de los brazos del arroyo Maldonado al sur este del centro de la ciudad de La Plata, en el Barrio Villa Elvira específicamente en la manzana entre la avenida 7, calle 8, 85 y 86 siendo un sitio de muy fácil acceso. Este sitio se caracteriza por ser un ambiente lótico de bajo flujo y caudal por lo que presenta variaciones marcadas del nivel de agua durante el año, dependientes de las lluvias. El canal posee 6, 35 metros de ancho, los márgenes son empinados y presenta poca vegetación asociada, ya que al estar próximo a las viviendas se realizan desmalezados con regularidad. **El sitio 11** se ubica en la zona baja del arroyo el Gato, cercano a su desembocadura sobre el camino Costanero Almirante Brown que al ser una calle asfaltada facilita la accesibilidad. El sitio se caracteriza por ser un ambiente lótico con mucho flujo y caudal, con poca variación del nivel de agua durante el año (no se seca). El canal posee 28 m de ancho y sobre el mismo se encuentra un puente. En cuanto a la vegetación se observó en la orilla *Sagittaria sp*, *Conium maculatum* y en ocasiones *Eichhornia crassipes* siendo arrastrados por la corriente hacia el Río de la Plata. **El sitio 12** se ubica en la zona media del arroyo “El Gato”, a 300 m de la Av. Domingo Mercante accediendo al mismo por una calle de tierra de fácil acceso. El sitio se caracteriza por ser un ambiente lótico con mucho flujo y caudal, con poca variación del

nivel de agua durante el año (no se seca). El canal posee 62 m de ancho, el borde es empinado y presenta diversas de plantas con gran prevalencia de *Dipsacus sp*, además de observarse mucha basura tanto en el borde como en el lecho del arroyo la cual es arrastrado hacia el Río de La Plata, ocasionalmente hay olor a podrido. **El sitio 13** se ubica a 50 metros del sitio 12 corresponde a un arroyo que atraviesa el relleno sanitario de la ciudad. El sitio se caracteriza por ser un ambiente lótico. El canal posee 4,5 m de ancho, presenta diversos arboles *Celtis tala*, y *Acacia sp* entre otros y pocas plantas palustres. **El sitio 27** se ubica en un campo situado en la calle Camino Costanero Almirante Brown y el acceso Fuerte Barragán, el acceso a este sitio es sencillo ya que la calle principal se encuentra asfaltada. En este campo se forman charcas temporarias con agua de lluvia de 340 m² aproximadamente con muy poca vegetación.



10- Villa Elvira



11- Zanjón



12- Gato



13- CEAMSE



27- Regatas

Figura 1.7. Sitios de estudio seleccionados para el estudio de la problemática urbana.

Para la problemática **industrial** representada por la petroquímica se seleccionaron 6 sitios (Figura 1.8). **Los sitios 14 y 15** se ubican sobre el canal que les da el nombre, sobre la Avenida del Petróleo Argentino lo cual les confiere fácil accesibilidad. El sitio 14 se encuentra a 5 km del centro de la Ciudad de la Plata en un sector que actualmente está siendo remedido por lo que presenta un sistema de aeración continua. El sitio 15 se encuentra más alejado de la ciudad (7 km) y no presenta ningún tipo de remediación. Ambos canales presentan un ancho de 23 m. En cuanto el tipo de ambiente, ambos corresponden con ambientes lóticos en donde el nivel del agua está regulado por las mareas del río, en los bordes del canal se puede observar la presencia de gran cantidad de gramíneas y plantas de *Ipomea palmata* y en la superficie del agua se ve una capa aceitosa. **El sitio 16** se encuentra en el Canal Oeste, a 8 km del centro de la Ciudad de la Plata sobre la calle Almafuerte. Dicha calle se encuentra asfaltada por lo que la accesibilidad el sitio es fácil. Este sitio se caracteriza por ser un ambiente lótico, que al igual que el Canal Este, el nivel de agua depende mayoritariamente de las mareas del Río de La Plata. El ancho del canal es de 25 m. Es un ambiente lótico, con poca vegetación. Se ha observado basura en el lecho de canal y la superficie del agua aceitosa.

Los **sitios 17 y 18** están ubicados en una zanja de desagüe que se encuentran al costado de la calle Camino Vergara a 6 y 5 Km del centro de la Ciudad de La Plata respectivamente. El sitio 17 se ubica frente a las antorchas de quemado de gas mientras que el sitio 18 se ubica frente a las torres de enfriamiento. Los sitios corresponden con un ambiente léntico con periodos de sequía, ya que el agua es principalmente de lluvia, la zanja tiene un ancho de 10 m y se puede encontrar una vegetación variada, observándose gramíneas, *Sagitaria sp*, *Juncus sp* y *Eucalyptus sp*. Las hojas de estos árboles caen a la zanja volviendo el agua de color oscura, en las zonas sin árboles se puede observar mayor desarrollo de plantas acuáticas como *Azolla sp* y *Hydrocotile ranunculoides*. Durante el tercer año que se tomaron muestras la zanja sufrió una serie de variaciones y remoción de sedimentos por lo que los muestreos se realizaron en uno u otro sitio dependiendo del sitio que se encontrara menos perturbado. **El sitio 19** se encuentra ubicado a 9 km del centro de la ciudad, frente a la arenera de Ensenada. Este sitio corresponde a una zona

baja de inundación que recibe básicamente agua de lluvia y en cuyo sitio hay un basural formado por desechos domiciliarios. El ambiente es léntico temporal y en sus alrededores se pudo observar la presencia de gramíneas, *C. tala* y *Iris pseudoacorus*. **El sitio 28** se encuentra ubicado sobre camino Rivadavia. Este sitio corresponde a una zona baja de inundación que recibe básicamente agua de lluvia formándose varias charcas. El ambiente es léntico temporal y en sus alrededores se pudo observar la presencia de *Eucalyptus sp.*



14- Canal Este



16- Canal Oeste



17- Fosforito



18- Simpson



19- Arenal



28- GESA

Figura 1.8. Sitios de estudio seleccionados para el estudio de la problemática industrial.

Para la problemática de **descargas cloacales** se seleccionaron dos sitios (Figura 1.9). El **sitio 20** ubicado en la costa del Río de la Plata, en la desembocadura de las descargas de efluentes cloacales. El acceso a este sitio se dificulta en periodos de lluvia y crecidas del río ya que el último tramo de la calle Avenida Río de la Plata no se encuentra asfaltada y se inunda fácilmente. El caño pluvial que desemboca en el río se encuentra roto generando un sitio donde se mezclan los efluentes cloacales y el agua de río, formando una zanja entre la vegetación costera en la cual domina la presencia de *Schoenoplectus californicus*. El **sitio 21** se encuentra ubicado en la ciudad de Chascomús, sobre el arroyo Girado. El arroyo tiene 2 m de ancho y se puede observar en su cercanía árboles de *C.tala* y *Salix sp* y en el borde del arroyo algunas gramíneas y plantas *Cucurbita moschata* y *Solanum lycopersicum*.



20- Cloaca La Plata



21-Cloaca Chascomús

Figura 1.9. Sitios de estudio seleccionados para el estudio de la problemática de descargas cloacales.

1.3.2 Caracterización climática del periodo estudiado (2015-2018)

En la Figura 1.10 se muestran los gráficos de precipitaciones y temperaturas para cada año desde 2015 a 2018 junto con el gráfico de valores normales esperados según los datos del periodo 1981-2010. Como se puede observar durante los años de estudio las temperaturas y precipitaciones fueron particulares con respecto al gráfico normal.

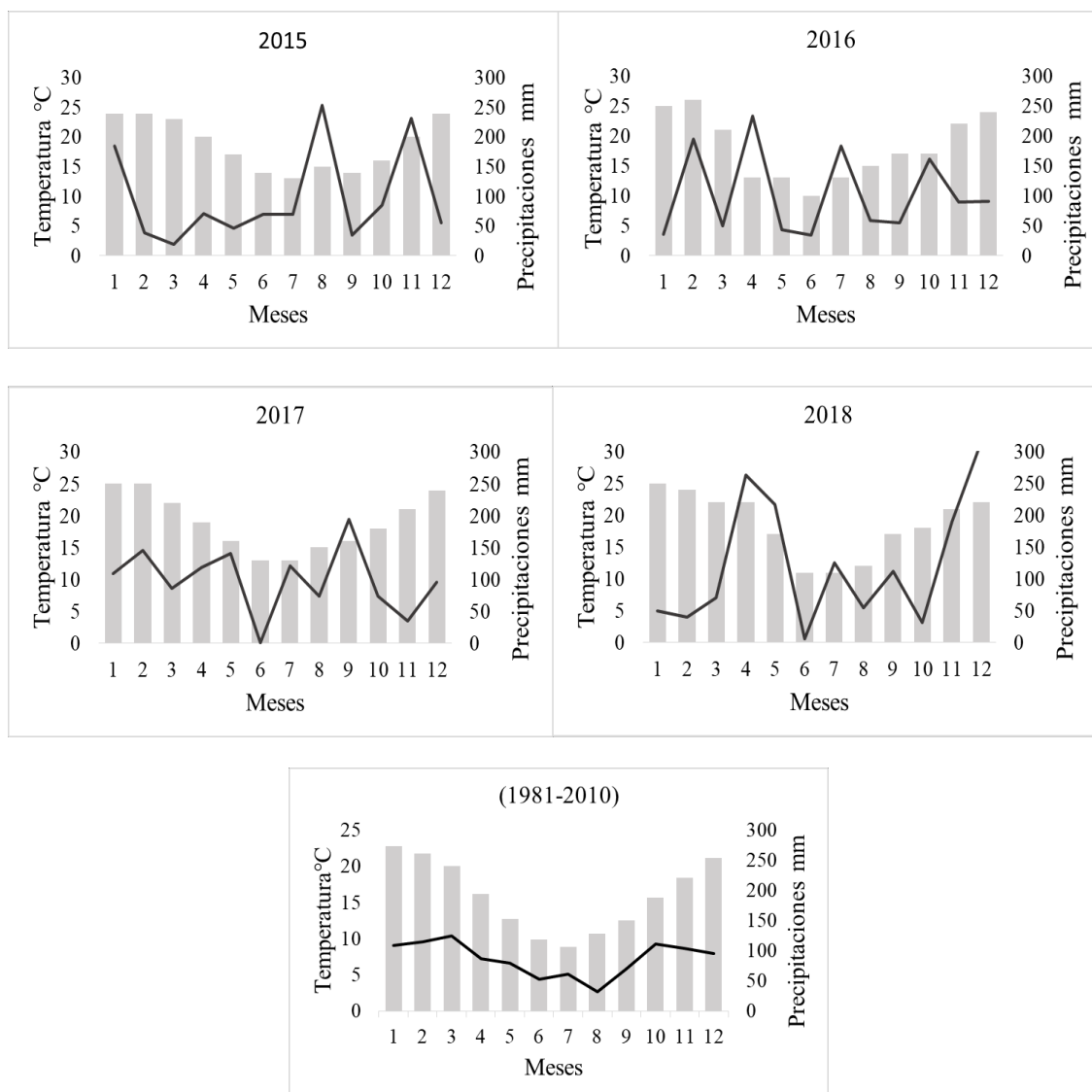


Figura 1.10. Gráficos de las precipitaciones y temperaturas medias mensuales del periodo estudiado (2015- 2018) y el gráfico de valores normales esperados según los datos del periodo 1981- 2010. Datos obtenidos del Servicio Meteorológico Nacional. El año se indica en la parte superior de cada gráfico. Los meses se referencian con números consecutivos desde Enero hasta Diciembre.

El promedio de las temperaturas media anual de los cuatro años fue de 18,52°C, siendo tres grados superiores a la observada normalmente en los datos del periodo (1981-2010). La precipitación media anual fue para 2015 de 96,4mm siendo este el año en el que se registró la menor media de precipitación observándose en los meses de enero, agosto, octubre y noviembre los valores máximos. Durante el año 2016, los meses más lluviosos

fueron febrero, abril, julio y octubre con valores de precipitación media de 102 mm. En 2017 las precipitaciones fueron muchos menores a las de los años anteriores con una media de 99,4 mm siendo los meses más lluviosos mayo y septiembre. En 2018 la precipitación media fue de 122,74 mm con precipitaciones máximas en los meses de abril y diciembre. Estas variaciones en las precipitaciones influyeron en los periodos reproductivos de las especies de estudio, las cuales se reprodujeron, en los meses de máxima precipitación manteniéndose dentro del periodo reproductivo descrito para cada especie.

La humedad relativa y la presión atmosférica media anual para el periodo estudiado se mantuvo en 80% y 1014,0 hPa respectivamente, muy cercado al valor normal del periodo (1981-2010), 79,8% y 1012 hPa.

La velocidad del viento promedio para el periodo de estudio fue de 15,26 Km/h siendo más alta que la registrada para el periodo de 1981- 2010 (12,8 Km/h).

Esta información fue empleada en la planificación y diseños de muestreo que contemplan los periodos reproductivos de las especies de estudio, incorporando información cada año y mejorando la precisión de las estimaciones y predicciones realizadas. Además, los datos obtenidos sirvieron para interpretar de manera conjunta con los datos obtenidos de las caracterizaciones fisicoquímicas de las charcas.

1.3.3 Caracterización fisicoquímica del agua y sedimento de los sitios de estudio

En la Tabla 1.4 se muestran los parámetros de calidad de agua de los sitios estudiados.

Tabla 1.4. Parámetros Fisicoquímicos

Problemática	Sitios	Temp.	pH	Cond.	OD	Dureza
Referencia	2	17,3 ± 0,00	6,07 ± 0,01	0,14 ± 0,001	0,87 ± 0,06	104,58 ± 2,45
	3	16,57 ± 0,51	6,38 ± 0,45	0,14 ± 0,001	1,8 ± 0,10	50,88 ± 8,48
	22	23,16 ± 1,11	7,89 ± 0,030	0,63 ± 0,01	6,93 ± 0,15	55,120 ± 4,24
Agrícola	5	21,9 ± 0,10	7,57 ± 0,15	0,27 ± 0,01	7,56 ± 0,15	69,25 ± 2,45
	8	24,8 ± 0,17	6,75 ± 0,02	0,21 ± 0,001	5,4 ± 0,17	67,84 ± 4,24
	9	24,83 ± 0,25	7,49 ± 0,01	0,24 ± 0,01	7,00 ± 0,026	39,57 ± 4,90
Urbana	11	23,90 ± 0,78	7,17 ± 0,03	0,56 ± 0,001	1,37 ± 0,12	31,09 ± 2,45
Industrial	14	25,80 ± 0,10	7,12 ± 0,01	1,081 ± 0,001	0,80 ± 0,20	118,72 ± 8,48
	16	26,03 ± 0,15	7,9 ± 0,01	0,62 ± 0,01	8,70 ± 0,10	142,75 ± 9,79
	28	25,43 ± 0,06	6,59 ± 0,04	0,38 ± 0,001	1000 ± 0,173	21,20 ± 00
Descargas cloacales	20	21,60 ± 3,45	7,09 ± 0,30	0,89 ± 0,44	0,87 ± 0,23	160,42 ± 76,72
	21	23,5 3± 0,06	7,54 ± 0,01	0,29 ± 0,001	0,90 ± 0,10	308,11 ± 2,45

Tabla 1.4. Continuación Parámetros Fisicoquímicos*

Problemática	sitios	Alcalinidad	NH4+	NO2-	NTF	NT	PT	PRS
Referencia	2	104,53 ± 11,32	0,004 ± 0,01	0,01 ± 0,001	1,69 ± 0,11	2,12 ± 0,23	1,14 ± 0,14	0,66 ± 0,02
	3	98,00 ± 0,001	0,09 ± 0,005	0,04 ± 0,001	2,28 ± 0,12	2,19 ± 0,17	0,87 ± 0,04	0,26 ± 0,02
	22	130,66 ± 11,316	0,00	0,14 ± 0,001	1,45 ± 0,033	1,40 ± 0,21	0,57 ± 0,04	0,07 ± 0,00
Agrícola	5	150,26 ± 11,32	0,04 ± 0,02	0,006 ± 0,00	1,31 ± 0,09	1,03 ± 0,14	1,87 ± 0,15	1,95 ± 0,10
	8	156,8 ± 19,60	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,001	1,81 ± 0,11	2,17 ± 0,25	2,48 ± 0,59	1,52 ± 0,92
	9	111,06 ± 11,32	0,05 ± 0,02	0,004 ± 0,001	0,63 ± 0,02	0,90 ± 0,13	3,12 ± 0,08	2,14 ± 0,06
Urbana	11	444,27 ± 22,63	0,42 ± 0,06	0,14 ± 0,007	1,53 ± 0,03	2,02 ± 0,17	0,76 ± 0,15	0,18 ± 0,03
Industrial	14	182,93 ± 11,32	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,001	1,07 ± 0,02	1,23 ± 0,35	0,63 ± 0,10	0,05 ± 0,00
	16	437,73 ± 90,53	1,36 ± 0,25	0,02 ± 0,02	1,47 ± 0,08	3,05 ± 0,55	0,99 ± 0,10	0,30 ± 0,04
	28	307,07 ± 11,31	0,12 ± 0,08	0,01 ± 0,001	1,31 ± 0,13	1,76 ± 0,39	1,49 ± 0,19	0,73 ± 0,05
Descargas cloacales	20	225,4 ± 90,03	2,74 ± 2,55	0,01 ± 0,01	0,57 ± 0,5	34,67 ± 10,35	1,57 ± 0,02	1,12 ± 0,58
	21	816,66 ± 11,32	2,37 ± 0,41	1,64 ± 0,39	6,98 ± 1,87	29,88 ± 6,22	4,38 ± 0,03	2,65 ± 0,07

Problemática	sitios	DQO	ST	SS	SD	LOI
Referencia	2	148,67 ± 53,26	222,33 ± 6,66	25,00 ± 7,21	197,33 ± 8,96	9,86 ± 2,52
	3	100,69 ± 18,16	169,00 ± 6,08	5,33 ± 1,53	163,67 ± 6,11	9,93 ± 0,54
	22	96,68 ± 1,75	563,33 ± 17,47	253,66 ± 19,65	309,67 ± 10,78	2,65 ± 0,21
Agrícola	5	52,72 ± 3,42	308,66 ± 9,02	44,33 ± 3,79	264,33 ± 12,34	4,3 ± 0,57
	8	56,06 ± 1,92	330,33 ± 12,10	71,00 ± 12,12	259,33 ± 23,59	15,58 ± 19,30
	9	61,50 ± 6,73	222,66 ± 12,01	52,30 ± 5,13	170,33 ± 14,57	15,51 ± 3,07
Urbana	11	19,81 ± 3,305	378,66 ± 8,50	28,00 ± 20,70	350,66 ± 22,72	6,27 ± 1,05
Industrial	14	21,44 ± 6,889	674,33 ± 7,09	6,66 ± 5,51	667,66 ± 3,21	
	16	45,45 ± 4,58	402,33 ± 7,76	16,33 ± 0,58	386,00 ± 8,18	
	28	73,66 ± 7,54	335,66 ± 23,62	80,33 ± 4,93	255,33 ± 23,11	9,95 ± 0,71
Descargas cloacales	20	56,95 ± 6,543	502,16 ± 208,47	16,66 ± 10,97	485,5 ± 217,13	31,28 ± 18,56
	21	75,93 ± 10,28	2018,33 ± 1,15	21,66 ± 19,50	1996,66 ± 18,82	23,97 ± 0,16

*La Temperatura (Temp.) fue expresada en °C, la Conductividad (Cond) en μ Simens/m, el Oxígeno disuelto (OD) en mg/l, la Dureza y la Alcalinidad en mg CaCO₃/L, NH₄⁺, NO₂⁻ y el Nitrógeno total filtrado (NTF) en mg/l, Fósforo total (PT) y fosforo reactivo soluble en mg/l, la Demanda Química de oxígeno (DQO) en mg O₂/l, Sólidos totales (ST), Sólidos en suspensión (SS) y Sólidos disueltos (SD), en mg/l y el Peso seco (LOI) % de pérdida de peso en ignición.

De la lectura e interpretación de cada uno de los parámetros evaluados de modo general podemos decir que:

Las temperaturas registradas en los diferentes cuerpos de agua no presentaron diferencias significativas. Por lo tanto, no se detectaron rangos de temperatura que pudieran provocar efectos o que pudieran interpretarse como indicadores de contaminación térmica.

Los valores de pH hallados en los cursos de agua estudiados permanecieron entre 6 y 7,90 mg/l en los diferentes sitios. Según los índices de calidad del agua de la Nacional Sanitation Foundation index (NSF-Manual EPA II-I), los valores óptimos de pH están comprendidos entre 7,2 y 7,4. Por otro lado, el rango de pH 6,5-9,0 es considerado protector para los anfibios por lo cual la mayoría de los valores hallados están en esos rangos o próximos.

En cuanto a la conductividad los sitios, 14 de la petroquímica y 20 de la cloaca presentaron valores significativamente mayores al resto de los sitios ($F(9,23) = 19,195$ $p < 0,005$), lo que se explica por la gran cantidad de iones disueltos asociados a contaminación química.

Los valores de oxígeno disuelto fueron superiores a los indicados o recomendados para la vida acuática (5mg/l) a excepción de los sitios 20 y 21 de las descargas cloacales, 14 de la petroquímica, y en dos ocasiones sitios 2 y 3 de referencia, asociados con el alto contenido de materia orgánica.

La mayoría de los sitios presentaron un agua de blanda a moderadamente dura (13 a 120 mg/l de CO_3Ca) a excepción de los sitios 15 y 20 en los cuales la dureza dio entre 121 y 180 mg/l de CO_3Ca correspondiéndose con un agua dura y el sitio 21 que se correspondió con un agua muy dura (>181 mg/l CO_3Ca). En cuanto a la alcalinidad los sitios 11, 16 y 21 presentaron una alcalinidad significativamente mayor que el resto de los sitios ($F(9,26) = 19,195 < 0,05$). El nitrógeno total y el LOI fueron significativamente mayores en los sitios 21 y 20 ($F(7,19) = 2,714$ $p < 0,005$).

La DQO fue significativamente mayor en el sitio 2 y significativamente menor en el sitio 11 ($F(9,23) = 24,187$ $p < 0,005$) En cuanto a los sólidos los sitios 14 y 21 presentaron concentraciones significativamente mayores que el resto de los sitios ($F(9,23) = 11,391$ $p < 0,005$), este aumento se corresponde a su vez con una mayor concentración de sólidos en dilución en estos sitios ($F(9,23) = 87,330$ $p < 0,005$).

En cuanto al nitrógeno total medido, los sitios perteneciente a la problemática de descargas cloacales presentaron valores significativamente mayores a los observados para el resto de los sitios ($F(11,27) = 27,295$ $p < 0,001$), así como también valores significativamente mayores de amoníaco ($F(11,27) = 4,2790$ $p < 0,005$).

Los valores de fósforo medidos fueron significativamente mayores en los sitios pertenecientes a la problemática agrícola ($F(11,27) = 88,491$ $p < 0,005$).

En la figura 1.11 se observa el análisis de componentes principales realizado con todas las variables medidas en los sitios. En el gráfico B se puede observar que estos parámetros permiten diferenciar las problemáticas ambientales. El factor 1 nos permite diferenciar, hacia el lado derecho del gráfico, a los sitios correspondientes a las descargas cloacales las cuales se asocian con valores elevados de dureza, alcalinidad y nitrógeno total, en el cuadrante superior derecho se diferencia el sitio 20 asociado a altos valores de amoníaco, mientras que en el cuadrante inferior derecho se diferencia el sitio 21 asociado a valores elevados de nitrógeno filtrado total y fósforo reactivo soluble. Por otro lado, en el cuadrante superior izquierdo se pueden diferenciar los sitios de la problemática industrial y urbana asociados con altos valores de Nitrito y por último en el cuadrante inferior izquierdo se diferencian los sitios de referencia asociadas con una elevada demanda química de oxígeno.

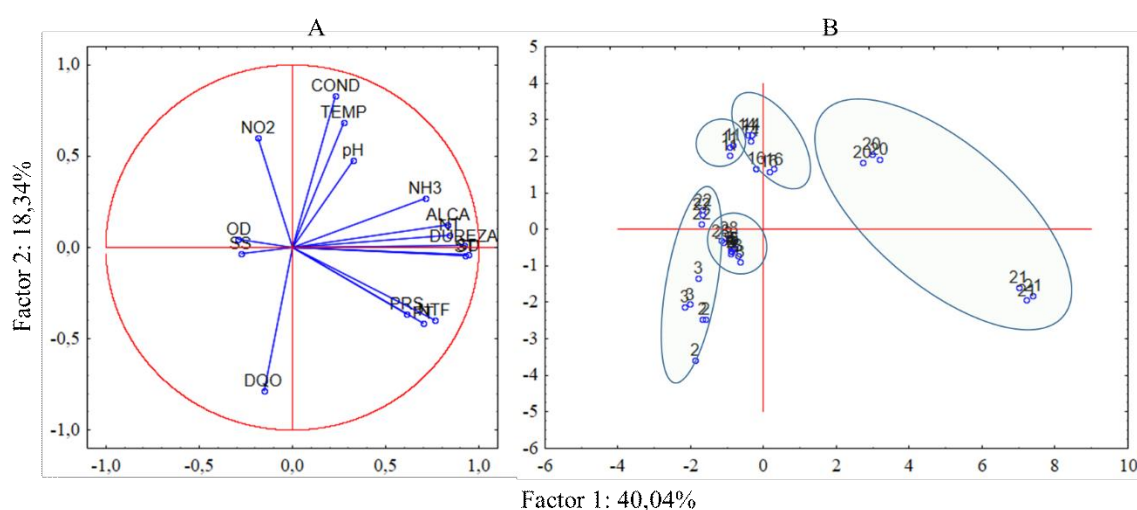


Figura 1.11. Análisis de componentes principales PCA para los parámetros fisicoquímicos tomados en los sitios de estudio. A-Proyección de las variables en el plano según los factores 1 y 2. Temperatura (Temp), Conductividad (Cond), Oxígeno disuelto (OD), Alcalinidad (Alca)-Demanda química de oxígeno (DQO) Solidos totales (ST), Sólidos en suspensión (SS) y Solidos disueltos (SD), Nitrito (NO₂) Amoníaco (NH₃), Nitrógeno total (NT), Nitrógeno total filtrado (NTF), Fósforo total (FT), Fósforo reactivo soluble (FRS) B- proyección de los sitios en el plano según lo factores 1 y 2. Los sitios de referencia (2, 3 y 22), agrícolas (5, 8 y 9), urbano (11), industrial (14, 16 y 28) y descargas cloacales (20 y 21).

Producto de una exhaustiva revisión bibliográfica se constataron indicios de contaminación ambientales en las diferentes zonas de estudio. En la tabla 1.5 se muestran las concentraciones de contaminantes detectadas con sus respectivas citas.

Los sitios tomados como **referencia** presentan, en muestras de agua, niveles de concentración de metales pesados minoritarios, no detectables con las técnicas analíticas empleadas o cercanos a dicho límite. Los dos metales más abundantes detectados Fe y Mn están dentro de los valores esperables para a región. Para las muestras de sedimento los niveles detectados de metales son inferiores a los niveles guías de calidad en sedimento (IADC/CEDA, 1997 Environment, 2002), no presentando problemas para la vida acuática. En estos sitios, además se midieron las concentraciones de hidrocarburos

totales en muestras de sedimento, las cuales resultaron por debajo de los valores guías y las presencias de plaguicidas tanto en muestras de agua como de sedimento no fueron detectadas (M. Agostini *et al.*, 2013; Guillermo Sebastián Natale, 2006; M. L. Peluso, 2011; Rimoldi *et al.*, 2018).

En la zona **agrícola**, Camilión *et al.* (2003) detectaron altas concentraciones de plomo y zinc en muestras de sedimentos. Agostini *et al.* (2013b), (Mac Loughlin, Peluso, & Marino, 2017) y (Sansiñena *et al.*, 2018) detectaron concentraciones de plaguicidas en muestras de sedimento (Glifosato, ácido Aminometilfosfónico, Atrazina, Trifluralina, Cipermetrina, Lamndacialotrina, Clorpirifos, Endosulfan, Acetaclor, Azoxystrobin y Epoxiconazole). Lamentablemente en la zona no se midieron concentraciones de hidrocarburos y medicamentos para comparar con el resto de las zonas.

En la **zona urbana** (Camilión *et al.*, 2003) y (Peluso *et al.*, 2011; Peluso, 2011) detectaron, en muestras de sedimentos altas concentraciones de metales (cobre, plomo, zinc y cadmio), concentraciones bajas de hidrocarburos totales y no detectaron presencia de plaguicidas. Por otro lado, (Elorriaga, Marino, Carriquiriborde, & Ronco, 2013) detectaron altas concentraciones de medicamentos (Atenolol, Cafeína, Carbamacepina, Ibuprofeno y Diclofenac).

En la **zona de la petroquímica** diferentes investigadores (Colombo, Khalil, Arnac, Horth, & Catoggio, 1990; Labunska, Brigden, & Stringer, 2000; Alicia Ronco, Peluso, Jurado, Rossini, & Salibian, 2008), detectaron concentraciones elevadas de metales pesados, hidrocarburos totales y plaguicidas.

Por último, la **zona de desagües cloacales** Colombo *et al.* (1990), detectaron en muestras de agua del Río de la Plata, concentraciones elevadas de ciertos plaguicidas (Lindano, DDTs,) y en muestras de sedimento y agua concentraciones elevadas de PCBs. Por otro lado, Elorriaga *et al.* (2013) y Valdés *et al.* (2015) detectaron altas concentraciones de fármacos y Estradiol en muestras de sedimento y agua respectivamente provenientes de la laguna de Chascomús.

Tabla 1.5. Concentraciones de contaminantes detectados en las zonas de estudio. *

		Cu	Pb	Zn	Cr	Fe	Mn	Cd	Al	Ca	Mg	Na	K	As	Hg	Ni	Hc total	plaguicidas		
Referencia	Camilio et al 2003 (mg/kg)	14,1	12,9	41,98	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	
	Natale 2006 (mg/l)	<0,01	<0,02	0,1	<0,01	2,47	0,32	<0,02	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nd
	Natale 2006 (mg/l)	<0,01	<0,02		<0,01			<0,02	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nd
	Peluso 2011 (mg/kg)	15,6	27,2	195	19,4	11,718		<1,0	46,57	nd	2,929	1562	3,906	0,35	0,04	15,6	<200		nd	

		Gly	AMPA	ATZ	TRF	CYP	λ-CYAL	CLP	END	AZX	EPX	ATC	Cu	Pb	Zn
Agrícola	Camilio et al 2003 (mg/kg)	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	27,7	73,4	130,2
	Agostini et al., 2013 (mg/kg)	nm	nm	nm	nm	3 ± 1	nm	5 ± 2	11 ± 9,3	nm	nm	nm	nm	nm	nm
	Mac Loughlin et al., 2017 (ng/g)	404	225,00	32,70	649,04	14,80	649	2258	14,80	153,00	214,30	nd	nm	nm	nm
	Sansiñena et al., 2018 (µ/mg)	nd	nd	nd	55,90	nd	265	26,00	16,00	nd	nd	17,70	nm	nm	nm

		Cu	Pb	Zn	Cr	Fe	Mn	Cd	Al	Ca	Mg	Na	K	As	Hg	Ni	Hc total	plaguicidas			
Urbano	Camilio et al 2003 (mg/kg)	41,42	115,74	153,6	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm		
	Peluso 2011 (mg/kg)	32,4	54	97,6	27	6,41	nm	1,08	34,921	nd	1,027	594	3,423	<0,35	0,11	10,8	<200		nd		
	Rimoldi et al 2018 (µg/l)	nd	nd	nd	nd	76,1	106	nd	nm	33	11,7	224	10,8	nd	nd	nd	nm				
	Rimoldi et al 2018 (µg/kg)	13,6	78,8	76,6	16,1	7600	96,6	nd	7600	nm	nm	nm	nm	nd	1,2	nd	nm		300 (CYP)		
		Atenolol	Cafeina	CARBA	IBU	DICLO															
	Elorriaga et al 2013 (µ/mg)	0,1	0,4	0,1	0,6	0,1															

		Cu	Pb	Zn	Cr	Fe	Mn	Cd	Ca	Mg	Na	K	As	Hg	Ni
Industrial	Colombo et al 1990 (ng/l)	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
	Colombo et al 1990 (ng/g)	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
	Greempace 2000 (mg/kg)	63,25	107,6	225	26	nm	411,5	11	nm	nm	nm	nm	nm	2,165	27,25
	Palermo 2011 (mg/kg)	116	61	610	275	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	72
	Peluso 2011 (mg/kg)	55,8	125	387	<2,5	34.263	nm	3,2	12994	5972	3.026	5436	18,2	6,8	39,7
		Hc total	Co	N° COI	HAP	COP	HA	PCBs	lindano	HCL	HCLEPOX	TRANS CL	DDTS	p,p'-DDT	CYP
	Colombo et al 1990 (ng/l)	nm	nm	nm	nm	nm	nm	49	60,1	nd	2,2	0,6	7,7	nm	nm
	Colombo et al 1990 (ng/g)	nm	nm	nm	nm	nm	nm	54,8			1,5	8,6	21,9	nm	nm
	Greempace 2000 (mg/kg)	nm	34,25	18,50	10,67	2,00	8,33	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
	Palermo 2011 (mg/kg)	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
Peluso 2011 (mg/kg)	22361	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	15,9 (µg/Kg)	6,7 (µg/Kg)	

		AT	Cafeina	CARBA	IBU	DICLO	E1	E2	EE2	PCBs	lindano	HCL	HCLEPOC	TRANS CL	DDTS
Descargas Cloacales	Colombo et al 1990 (ng/l)	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	13,8	49,2	nd	2,9	nd	nd
	Colombo et al 1990 (ng/g)	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	3	nd	nd	0,07	0,2	1
	Elorriaga et al 2013 (µ/mg)	nd	0,1	0,3	4,5	<0,1	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
	Valdes et al 2014 (ng/l)	nm	nm	nm	nm	nm	<lod	122	80	nm	nm	nm	nm	nm	nm
	Elorriaga et al 2013 (µ/mg)	<1	13,2	<1	<1	<1	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
	Valdes et al 2015(ng/l)	nm	nm	nm	nm	nm	<lod	631	65	nm	nm	nm	nm	nm	nm

*1- referencia; 2 agricola; 3- urbana; 4 industrial; 5- descargas cloacales. Hc: Hidrocarburos totales, GLY: Glifosato, AMPA: Acido Aminometilfosfonico, ATZ: Atrazina, TRF: Trifluralina, CYP: Cipermetrina, λ-CYAL: Lambdacialotrina, CLP: Clorpirifos, END: Endosulfan, AZX: Azoxystrobin, EPX: Epoxiconazole. ATC: Acetador, CARBA: Carbamazepina, IBU: Ibuprofeno: DICLO: Diclofenac, NCOI: Número de compuestos orgánicos identificados, HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos, COP: Compuestos orgánicos persistentes, HA: Hidrocarburos alifáticos, HCLEPX Heptador epóxido, TRANS CL: Trans- Clordan, AT: Atenolol, E1: Estrona, E2: 17b-estradiol, EE2: 17a-etinilestradiol, HCL: Heptadoro.

1.3.4 Relevamiento de anfibios

Los resultados de los relevamientos se presentan en la (Tabla 1.6).

SITIOS	Bp	D	Ss	Sg	Pm	Oa	Co	Llat	Ll	Lg	Pf	Ra	Rf	Riqueza
2	R							R				R	R	4
3	R	P	P	P	R	P	P	R	R	P	R	P	R	13
4	R									P				2
5												P		1
6	P												P	2
7														0
8	R			P				R	P	P	P	R	R	8
9	R								P					2
10														0
11														0
12				P							P			2
13				P							P			2
14														0
15														0
16	P													1
17	P													1
18	P				P									2
19	R	R			P	R		R	R			R	R	8
20	P	P			P			P			P	P		6
21	P							P				R		3
22	R				R			R				R		4
23	R				R							R		3
24											P	R		2
25	R				R			P	P		P	R	R	7
26	R							P	P			P	P	5
27											P	R		2
28	R			P				R	P		P	R	P	7

Tabla 1.6. Especies de anfibios detectados en los sitios de estudio Bp: *Boana pulchella*; D: *Dendropsophus Sp*; Ss: *Scinax squalirostris*; Sg: *Scinax granulatus*; Pm *Pseudis minuta*; Od: *Odontophrynus americanus*; Co: *Ceratophrys ornata*; Llat: *Leptodactylus latrans*; Ll: *Leptodactylus latinasus*; Lg: *Leptodactylus gracilis*; Pfpseudopaludicola *falcipes*; Ra: *Rhinella arenarum*; Rf: *Rhinella fernandezae*. *

*P: presencia, R: reproducción.

Se identificaron un total de 13 especies. La mayor riqueza de especies se observó en el sitio 3 de referencia. En siete sitios del agroecosistema se identificaron un total de 8 especies observándose la mayor riqueza en el sitio 8. En cinco sitios de la problemática industrial se identificaron un total de 8 especies, pero la reproducción de las mismas solo

se constató para el sitio 19 y 28, de los cuales el sitio 19 presentó la mayor riqueza, dentro de los sitios de esta problemática. En los sitios de descargas cloacales se observó la presencia de 6 especies presentando la mayor riqueza el sitio 21. Por último, en los sitios urbanos solo se detectó la presencia de tres especies en tres sitios.

Por lo tanto, según el número de las especies detectadas los sitios de referencia fueron los más ricos, seguidos en orden decreciente de riqueza por los sitios agrícolas, industrial, descargas cloacales y por último los sitios urbanos.

En cuanto a las especies de estudio, ambas se identificaron en al menos uno de los sitios de cada problemática a excepción de la urbana donde solo se detectó a *R. arenarum* en uno de los sitios.

Para el análisis detallado del ciclo reproductivo de las especies estudiadas se tuvo en cuenta la primera reproducción de *B. pulchella*, que ocurre a fines de otoño-principio de invierno, y la única para *R. arenarum* que ocurre a fin de primavera-principio de verano.

Como se observa en la Figura 1.12 el aumento en la abundancia relativa de *B. pulchella* y *R. arenarum* están asociado a eventos posteriores de precipitación intensa en los sitios reproductivos. En el caso de *B. pulchella* este aumento se ve, a su vez asociado con el descenso de la temperatura a diferencia de *R. arenarum* que se da con aumentos en la temperatura. En los años de estudio la reproducción de las especies ocurrió según lo esperado en cuanto a las precipitaciones y temperaturas. Durante 2015 *B. pulchella* se reprodujo más tarde que otros años (aproximadamente 2 meses) probablemente debido a las altas temperaturas registradas ese año y las pocas lluvias al comienzo del año, por el contrario la especie *R. arenarum* comenzó su reproducción en el mes de septiembre con un pico máximo de actividad en noviembre cuando las precipitaciones aumentaron. En 2016 y 2018 *B. pulchella* se reprodujo en abril y *R. arenarum* en septiembre, coincidiendo con los meses de mayor lluvia. En 2017 las especies se reprodujeron en mayo (*B. pulchella*) y a principios de octubre (*R. arenarum*) nuevamente coincidiendo con las mayores precipitaciones y la disminución o aumento de la temperatura en el caso de cada especie.

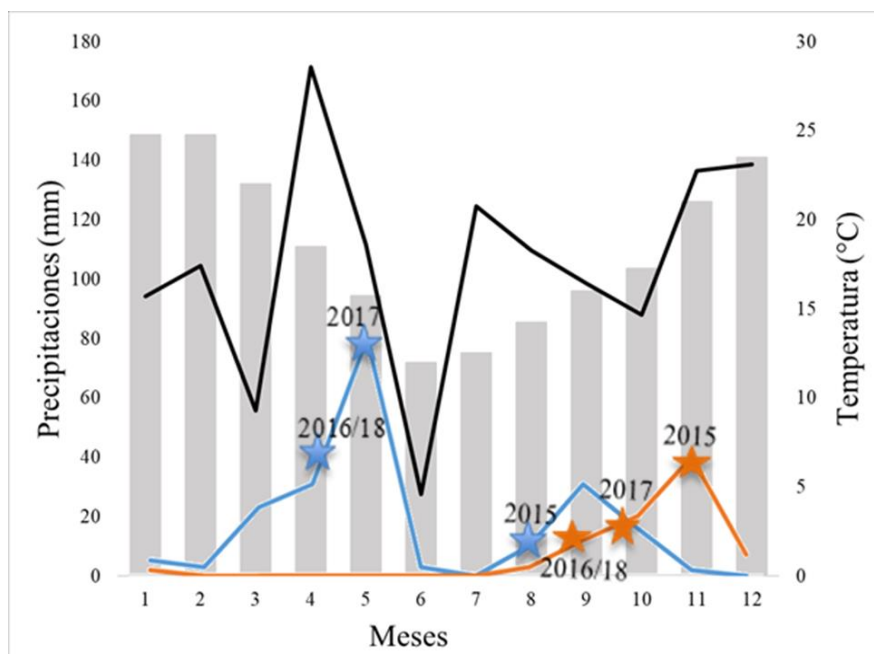


Figura 1.12. Abundancia relativa por mes de *B. pulchellus* (línea Azul) y *R. arenarum* (línea naranja) estimado en individuos colectados a campo en función de las precipitaciones (línea negra) y temperatura (barras) corresponden al periodo comprendido entre los años 2015-2018. La figura también permite visualizar los meses en que se reprodujeron las especies para cada año (estrellas).

A partir de los muestreos realizados en el sitio 3 de referencia durante los años 2017 y 2018 se obtuvieron datos morfométricos de 110 machos y 80 hembras adultas de *B. pulchella*.

Tabla 1.7. Medidas de los individuos adultos de *B. pulchella* colectados en campo.

Año	Sexo	N	Longitud (cm)	Peso (g)	Long. Ventre (cm)	K
2017	Macho	46	4,01± 0,30	3,30±0,57		0,05±0,01
	Hembra	22	4,35±0,26	4,45±1,03	2,82±0,42	0,05±0,04
2018	Macho	64	3,94±0,40	3,28±3,64		0,05±0,01
	Hembra	58	4,39±0,63	4,47±2	3,45±4,83	0,05±0,05

*Se presentan los promedios de las mediciones ± el desvío estándar. Número de individuos (N). El índice de condición corporal (K) calculado como (peso /Longitud³).

Para el cálculo del índice de condición corporal de las hembras pre-reproductivas se obtuvieron datos de 30 amplexos registrados en el campo, sumado a datos previos obtenidos por el grupo de trabajo.

De los resultados obtenidos se constató que los machos no presentan diferencias significativas (o al menos detectables por este modo) en sus índices morfométricos al comparar antes y después de un evento reproductivo ($p > 0,05$), por otro lado, las hembras presentaron diferencias significativas en el índice K ($p < 0,05$) luego de un evento reproductivo. En la Tabla 1.8 se presentan los resultados obtenidos relacionados con el estado de condición reproductiva.

Tabla 1.8. Medidas de los individuos adultos de *B. pulchella* colectados en amplexo en campo.

	Sexo	N	Longitud (mm)	Peso (g)	K
Machos	Pre-rep.	50	39,36±3,72	3,20±0,83	0,051±0,013
	Post-rep.	50	40,72±3,67	3,54±0,88	0,052±0,007
Hembras	Pre-rep.	80	44,46±5,38	4,97±1,99	0,055±0,01
	Post-rep.	80	44,40±5,58	4,57±1,69	0,050±0,008

*Se presentan los promedios de las medidas ± el desvió estándar. Pre-rep: individuos pre-reproductivos, post- rep: individuos post reproductivos, Número de individuos (N). El índice de condición corporal (K) calculado como (peso /Longitud³).

A partir de los datos de hembras obtenidas en el campo y datos históricos del grupo de trabajo se realizaron correlaciones entre los pesos y las longitudes de los individuos (Figura 1.13).

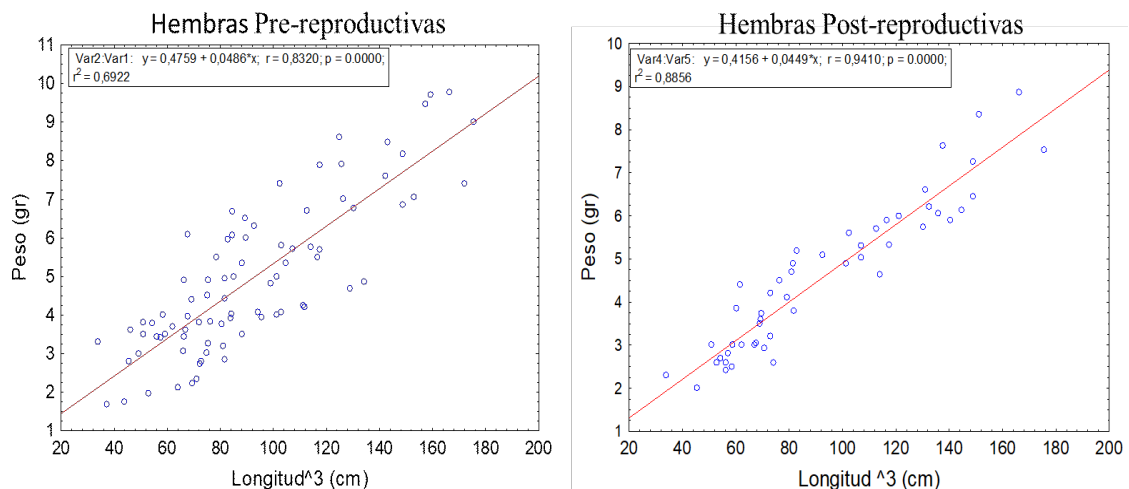


Figura 1.14- Gráficos de correlación entre las variables de peso y longitud³ de hembras de *B. pulchella* pre y post- reproductivas.

A partir de las ecuaciones de las rectas obtenidas se graficaron las rectas ajustadas logrando de este modo un gráfico que permitió determinar el estado reproductivo de las hembras colectadas en campo (Figura 1.14)

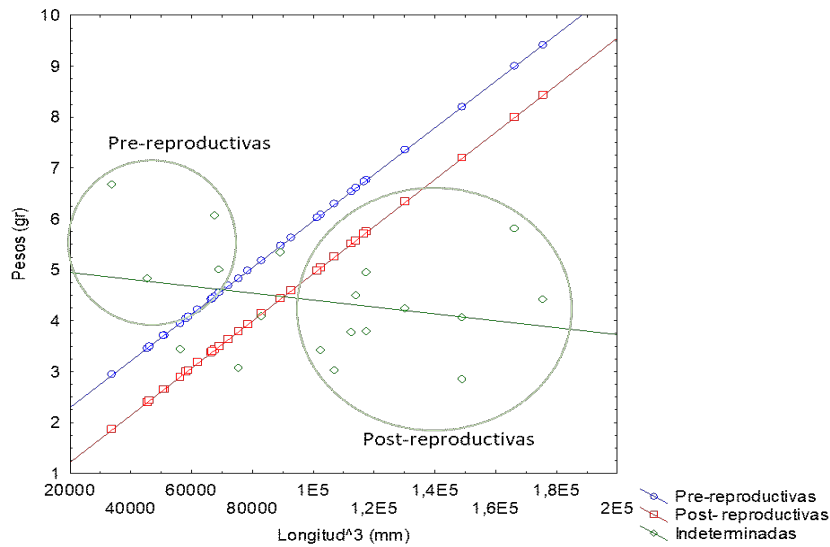
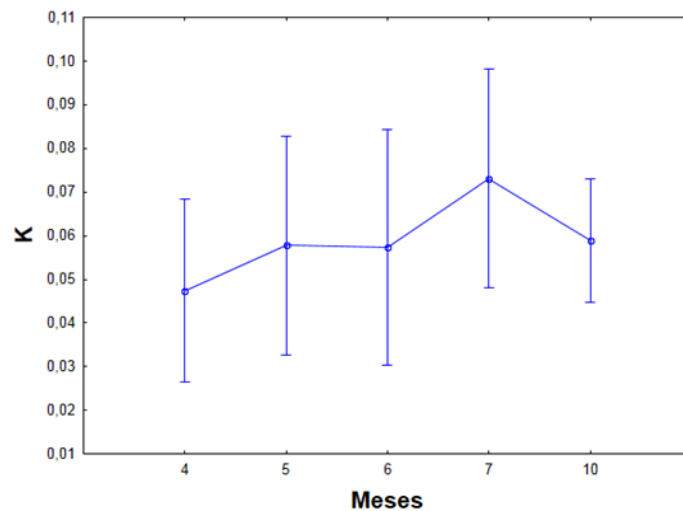


Figura 1.15- Gráfico de la correlación entre las variables de peso y longitud³ de hembras de *B. pulchella* pre y post-reproductivas.

Esto permitió calcular el índice de condición corporal de las hembras pre-reproductivas, en condiciones óptimas para lograr exitosamente la reproducción, este índice fue de $0,06 \pm 0,01$.

Del total de adultos observados en campo se colectaron 5 parejas por año, los cuales fueron criados en laboratorio para posteriores pruebas de inducción artificial de la reproducción.

Los adultos de *Boana pulchella* criados en condiciones controladas de laboratorio mostraron un incremento de los valores del índice K, respecto de los valores que presentaban en el momento inicial de cría en cautiverio. (Figura 1.15). En el mes de octubre el índice de condición corporal fue menor debido al ingreso de nuevos individuos. Estos resultados permitieron avalar la metodología utilizada en la crianza y



mantenimiento de la especie.

Figura 1.15. Índice de condición corporal en adultos de *B. pulchella* mantenidos en cautiverio. 4, 5, 6, 7 y 10: corresponden a los meses (Abril, Mayo, Junio, Julio y Octubre) transcurridos desde que fueron colocados por primera vez en las jaulas para la cría en cautiverio.

1.3.4 Inducción de la reproducción en *B. pulchella*

Siguiendo los resultados obtenidos, para la inducción se seleccionaron hembras que presentaban índices de condición corporal entre 0,04 y 0,07.

Los resultados de las inducciones mostraron que las parejas control no presentaron indicios de actividad reproductiva. Por otro lado, en el primer experimento, el método resultó efectivo para el 80% de los machos constatada por la emisión de cantos (machos 5 y 1) y la expresión de caracteres sexuales secundarios como la marcada coloración del saco bucal (machos 3 y 2) (Figura 1.16 A). Luego de 24 horas de ser inducidas se evidenció el amplexo de una pareja (pareja número 4) (Figura 1.16 B) y posterior desove (Figura 1.16 C). El peso total de la puesta fue de 17,21 g con un total de 2000 huevos aproximadamente. 48 h después de la primera inducción se inyectaron las parejas control observándose amplexos de las parejas 6 y 7 sin posterior desove (Figura 1.16 D).

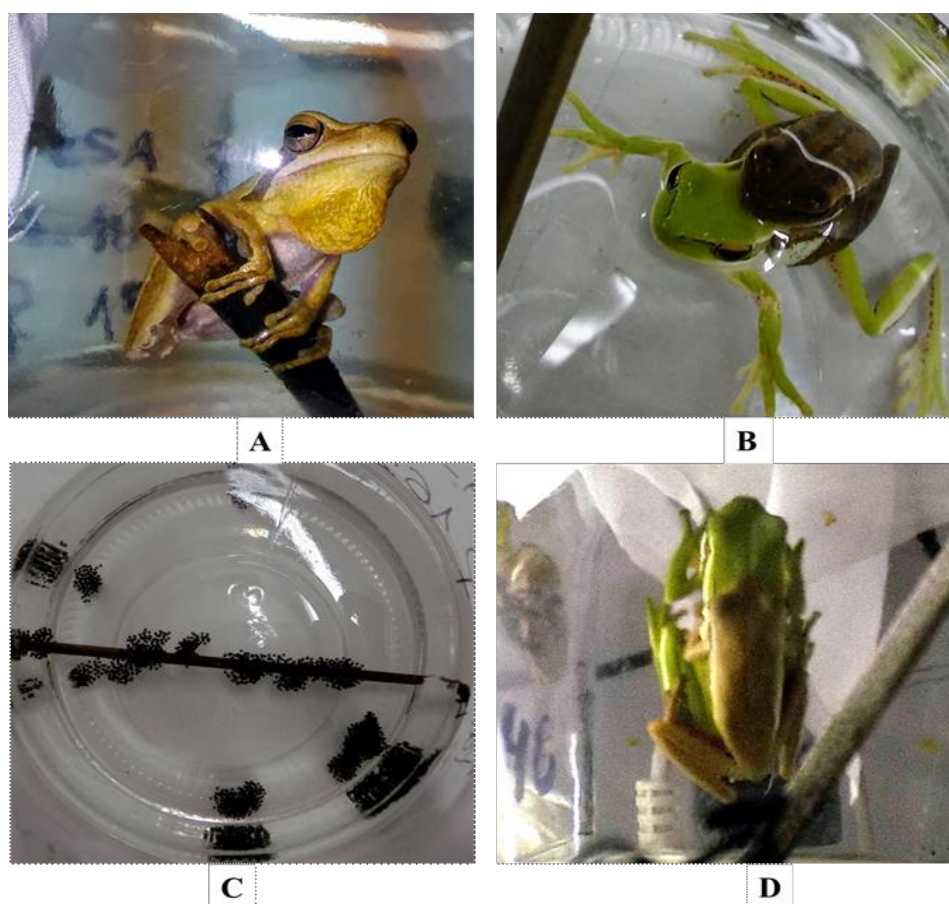
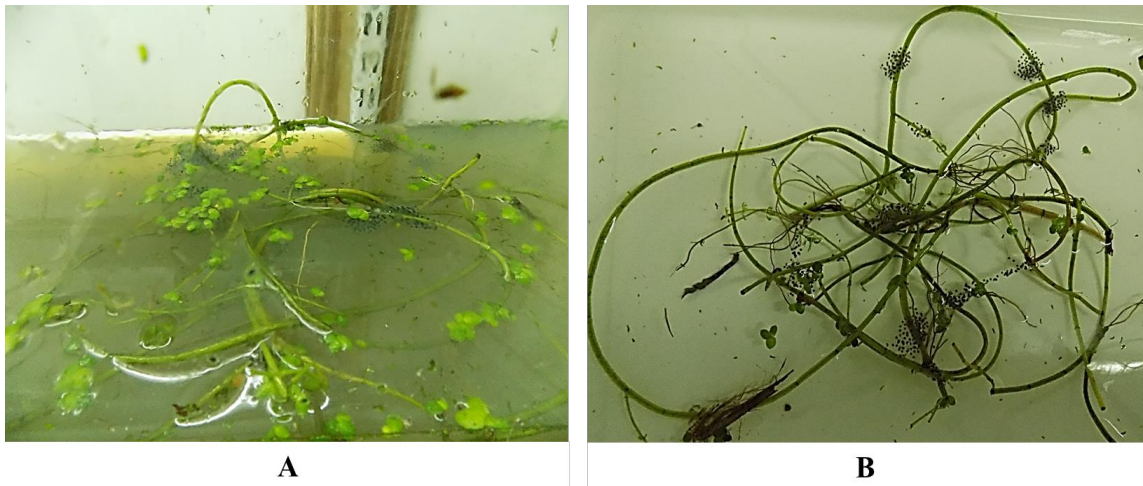


Figura 1.16. Inducción artificial de *B. pulchella*. A- Macho con saco bucal marcado. B- Amplexo de la pareja 4. C- Puesta de la pareja 4. D- amplexo de la pareja 6

En el segundo experimento el método resulto efectivo para el 100% de los machos evidenciado por la emisión de cantos y la expresión de caracteres sexuales secundarios como la coloración marcada del saco bucal. En las primeras 24 h no se evidenciaron amplexos ni puestas, por lo que se procedió a reiterar la dosis de AMPHIPLEX y se bajó la temperatura del cuarto de cría a 16°C. Luego de 48 h, se evidenció la presencia de una puesta (Figura 1.17) la cual tenía un peso total de 8,5 g y aproximadamente 800 huevos. Para determinar cuál de las hembras fue la que puso los huevos, se pesaron las hembras y se comparó el peso con el inicial. Concluyendo por la diferencia de pesos (1,42 g) que



la puesta correspondió a la hembra 2.

Figura 1.17. Inducción artificial de *B. pulchella*. Puestas de la hembra 2.

Por lo tanto, para ambas pruebas de inducción la proporción de éxito, expresada como cantidad de parejas que lograron la reproducción sobre cantidad de parejas inducidas fue de 0,13. Si bien estos resultados no son lo suficientemente concluyentes, en relación con su efectividad aportan evidencias que indican una respuesta favorable constituyendo las bases para continuar con la puesta a punto de la técnica.

1.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La ciudad de La Plata y sus alrededores contiene, gran diversidad de actividades y uso del suelo típicos de la Región Pampeana. Dentro de esta área se identificaron cuatro problemáticas ambientales (agrícola, urbana, industrial y descargas cloacales) y un área de referencia. Se seleccionaron en total 28 sitios por sus cercanías a las problemáticas plantadas, con fácil acceso y características típicas de los hábitats y nichos ecológicos de las especies estudiadas, constituyendo posibles sitios reproductivos de las especies de estudio.

Las temperaturas y precipitación medias, determinadas por el Servicio Metereológico Nacional para el período de estudio fueron acordes con los valores normales registrados entre 1981 y 2010 presentando variaciones naturales las cuales pueden ser explicadas

debido a fenómenos como El Niño, que genera un aumento de la temperatura y precipitaciones, y La Niña, que trae aparejado un descenso de la temperatura. El intenso episodio de El Niño 2015/2016 contribuyó a que se registraran temperaturas altas y más precipitaciones. Por el contrario, en el año 2017 comenzó con un episodio de La Niña muy débil. Estas variaciones climáticas influyeron en la reproducción de las especies de estudio que, si bien estuvieron dentro de los periodos de tiempo esperados, variaron año a año. Las altas temperaturas y poca lluvia ocurrida en los primeros meses del 2015 provocaron un retraso en la reproducción de *B. pulchella* mientras que las llegadas de las precipitaciones a fines del 2015 acompañadas de temperaturas altas favorecieron la reproducción temprana de *R. arenarum*. Las altas precipitaciones debidas al niño se mantuvieron en 2016 favoreciendo que la reproducción de ambas especies ocurra tempranamente. Mientras que para el año 2017 la llegada de la niña propicio las condiciones climáticas para que las especies se reproduzcan a principios de mayo (*B. pulchella*) y Octubre (*R. arenarum*).

Los resultados de los parámetros de calidad de agua medidos en los sitios estudiados y la recopilación de información de mediciones de contaminantes en las zonas de estudio permitieron realizar una caracterización de las zonas estudiadas. La zona de referencia presento niveles de temperaturas, pH y conductividad acordes a los niveles guía para la protección de la vida. Los niveles de oxígeno resultaron ser más bajos de lo esperado esto seguramente se deba a que estos cuerpos de agua se encontraban con mucha vegetación, gran parte de ella en descomposición, lo que se puede observar también en una elevada DQO. En cuanto a la bibliografía, Camilion *et al* (2003), Natale (2006) y Peluso (2011) detectaron en estos sitios concentraciones bajas de metales pesados e hidrocarburos totales, y no detectaron presencia de plaguicidas. Los resultados obtenidos y la información proveniente de la literatura existente contribuyen a la hipótesis de que estos sitios no se encuentran afectados por la actividad antrópica evaluada. Por lo tanto, estos sitios son adecuados como sitios de referencia.

La zona agrícola presentó niveles de temperaturas, oxígeno, pH y conductividad acordes a los niveles guía para la protección de la vida. El agua de estos sitios es blanda con alta alcalinidad lo que le confiere una gran amortiguación de los ácidos, presenta además una elevada cantidad de sólidos disueltos en comparación con los sitios de referencia y concentraciones elevadas de fósforo siendo estos superiores a los esperados para aguas no contaminadas (0,01 mg/l), lo cual puede estar indicando un ingreso de fósforo al ambiente que puede provenir de las tierras fertilizadas. En cuanto a la bibliografía, trabajos previos en la zona determinaron concentraciones altas de metales pesados (Camilion *et al.*, 2003) y de varios plaguicidas en muestras de sedimento (Agostini *et al.*, 2013; Mac Loughlin *et al.*, 2017 y Sansiñena *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos y la información proveniente de la literatura existente contribuyen a la hipótesis de que estos sitios se encuentran afectados por la actividad agrícola. Por lo tanto, estos sitios son adecuados para evaluar esta problemática.

La zona urbana presentó parámetros acordes a los reportados para la región, a excepción de una elevada concentración de Nitritos lo cual puede indicar la presencia de procesos biológicos activos, influenciados por contaminación orgánica. En cuanto a la bibliografía consultada se detectaron en la zona, altas concentración de metales pesados, concentraciones normales de hidrocarburos totales y no detectaron plaguicidas en muestras de sedimento (Camilion *et al.*, 2003 y Peluso., 2011). Por otro lado, las mediciones de Elorriaga *et al.* (2013) detectaron la presencia de medicamentos en muestras de sedimento. Los resultados obtenidos y la información proveniente de la literatura existente contribuyen a la hipótesis de que estos sitios se encuentran afectados por la actividad urbana. Por lo tanto, estos sitios son adecuados para evaluar esta problemática.

La zona industrial presentó valores normales de temperatura, oxígeno disuelto y pH. Por otro lado, los niveles de conductividad fueron mucho mayores que los registrados en otros sitios presentando a su vez una gran cantidad de solidos disueltos. Los trabajos previos realizados en la zona detectaron altas concentraciones de metales pesados (mayores a las registradas para la zona urbana), hidrocarburos y algunos plaguicidas (Colombo *et al.*, 1990; Labunska, Brigden and Stringer, 2000; Ronco *et al.* 2008; Palermo *et al.* 2011). Los resultados obtenidos y la información proveniente de la literatura existente contribuyen a la hipótesis de que estos sitios se encuentran afectados por la actividad industrial. Por lo tanto, estos sitios son adecuados para evaluar esta problemática.

Las zonas de descargas cloacales presentaron valores normales de temperatura y pH (Serra, *et al.*, 1992). La conductividad fue muy alta correspondiéndose con la alta salinidad resultando en aguas muy duras con cantidades elevadas de solidos disueltos. Los niveles de oxígeno disuelto se encontraron por debajo de los reportados como apropiados para la vida, posiblemente debido al contenido de materia orgánica que resulto ser muy alto, así como también la concentraciones de nitrógeno total y de sus especies iónicas lo cual puede estar indicando aportes antropogénicos En cuanto a la bibliografía, para esta zona se reportaron en varios trabajos elevadas concentraciones de contaminantes emergentes, típicos de contaminación de descargas cloacales (Elorriaga *et al.*, 2013; Valdés *et al.*, 2015). Estos resultados apoyan la utilización de estos sitios como representantes de la problemática descarga de efluentes cloacales.

De la interpretación conjunta de los resultados obtenidos en el presente trabajo y de la información proveniente de las publicaciones existentes surgen evidencias suficientes para caracterizar los sitios de estudio en relación a las problemáticas que los afectan.

El relevamiento de las especies de anuros presentes en los diferentes sitios de estudio permitió evidenciar que, en los sitios pertenecientes a las problemáticas urbana, industrial y descargas cloacales la riqueza de especies es mucho menor a la observada en los sitios de referencia, además en la mayoría de estos sitios no se evidenció la reproducción de las

pocas especies relevadas. Estos resultados son acordes con el perfil químico presentado anteriormente en cual se evidenció la presencia de contaminantes ambientales que podrían estar afectando a las poblaciones de anuros. Si bien los resultados obtenidos indican que algunas especies no están presentes en los sitios afectados (actuando como indicadoras), consideramos que dicha afirmación requiere la realización de estudios ecológicos más detallados en los sitios, que escapan a los objetivos y duración de esta tesis. Estos estudios están siendo realizados por el grupo de trabajo, y se espera contar con mayor información al respecto.

Las especies, *Scinax squalirostris*; *Scinax granulatus*; *Odontophrynus americanus*; *Ceratophrys ornata*; *Leptodactylus gracilis* son buenas candidatas para ser utilizadas como indicadores.

Las dos especies de estudio fueron identificadas y se constató su reproducción en al menos un sitio de cada problemática a excepción de los sitios urbanos, en los cuales solo se constató la presencia y reproducción de *R. arenarum* en un sitio. Como se dijo anteriormente las especies de estudio se reprodujeron de acuerdo a lo esperado según las condiciones climáticas presentadas en cada año y de manera simultánea en el área de estudio.

Mediante la recolección de datos morfológicos de la población de *B. pulchella* presente en el sitio 3 de referencia se logró establecer un valor de referencia que permitió identificar hembras pre-reproductivas en estado óptimo para ser inducidas con éxito.

La cría en cautiverio en las condiciones establecidas fue exitosa, observando un aumento en el índice de condición corporal de los individuos a lo largo de los meses. Si bien los resultados de las pruebas de inducción artificial no fueron suficientemente concluyentes, en relación a su efectividad, aportan evidencias que indican una respuesta favorable, constituyendo las bases para continuar con la puesta a punto de la técnica.

Considerando lo expuesto anteriormente concluimos que **la reproducción de *B.pulchella* en laboratorio es posible y el uso del índice de condición corporal para detectar hembras en estado óptimo de oviposición es una buena herramienta.**

CAPÍTULO 2: CARACTERES MORFOLÓGICOS LARVARIOS SENSIBLES A FACTORES DE ESTRÉS.

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Larvas de anuros como modelo de estudio

La utilización de animales como modelo de estudio ha permitido acceder al conocimiento sobre aspectos básicos de numerosos procesos biológicos fundamentales. El entendimiento de estos procesos, que en la actualidad conforman parte del paradigma de la biología, permite realizar inferencias y deducciones y/ o explicar procesos relacionados, e incluso aquellos que ocurren a otros niveles biológicos superiores y que poseen mayor complejidad. Este abordaje ha permitido lograr importantes avances en la comprensión de los procesos que conforman y dan sustento a los principios básicos de la genética, la fisiología, bioquímica y la etología, entre otras disciplinas biológicas.

Las larvas de anuros, poseen características que las predisponen como un modelo útil de estudio. Entre estas características podemos mencionar su pequeño tamaño, puestas con elevado número de huevos debido a la alta tasa reproductiva del grupo, su modo de vida acuático, su posición relativamente baja en la cadena trófica, y la breve duración de su fase de vida larval. Sumado a estas características, está la facilidad de mantenimiento en cautiverio, y su alta tasa de supervivencia incluso a altas densidades, lo cual es fundamental a la hora de elegir un modelo de estudio.

El estudio de la biología del desarrollo se ha beneficiado enormemente de los conocimientos adquiridos utilizando anuros como modelos experimentales. El modelo predominante es *Xenopus sp*, pero gran parte del conocimiento embriológico deriva de la investigación sobre otras especies de anuros. En el trabajo de Callery (2006) se puede encontrar una revisión de las contribuciones de los anfibios al avance de la biología del desarrollo que sustenta lo antedicho.

Las vías y procesos de formación de órganos se conservan filogenéticamente en el linaje de los vertebrados, por lo tanto, los conocimientos adquiridos en estudios, que utilizan anuros como modelo, pueden ser extrapolables a otros vertebrados, incluido el ser humano (Schmitt, Gull, & Brändli, 2014). Estos aportes favorecen y han contribuido en el pasado al desarrollo de innumerables tratamientos y terapias en el campo de la medicina humana (Burggren & Warburton, 2005).

Estos son algunos de los principales argumentos y motivos que nos llevaron a emplear a las larvas de anuros como organismos modelos y objetos de estudio para el desarrollo de este trabajo de tesis.

2.1.2 Descripción de la Anatomía larval normal

Actualmente se reconocen 8042 especies de anuros que habitan el planeta, las larvas de estas especies presentan, por lo tanto, una gran diversidad de formas y tamaños que se relaciona a su vez, con sus hábitos de vida (ej: alimentación y hábitat que ocupan). A pesar de las diferencias asociadas con esta gran diversidad, comparten características anatómicas como resultado de su adaptación a los hábitos de vida acuática que la mayor parte de las especies posee como factor común, lo que permite construir un modelo general para describir la morfología larval (Figura 2.1 A).

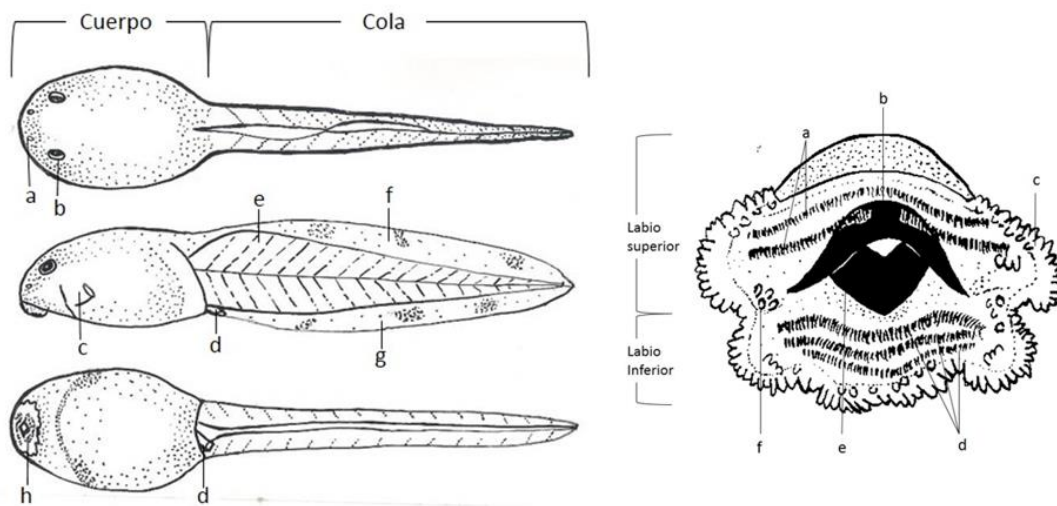


Figura 2.1. A- Morfología de larva acuática: a- narinas, b- ojos, c- espiráculo, d- Tubo anal, e- musculatura de la cola, f- aleta dorsal, g- aleta ventral, h- disco oral. **B-** Detalle del disco oral: a- 1° y 2° fila de queratodontes superiores, b- Vaina de la mandíbula superior, c- papilas marginales, d- 1°, 2° y 3° fila de queratodontes inferiores, e- Vaina de la mandíbula inferior, f- papilas submarginales.

Las larvas de hábitos acuáticos presentan la cabeza y el tronco no diferenciados, formando una masa globular hidrodinámica (Lavilla & Rouges, 2004) denominada cuerpo que es claramente diferenciable de la cola. En la región anterior ventral del cuerpo presentan un disco oral (Figura 2.1 B) que rodea a la boca el cual posee un margen cubierto de papilas, las que presentan gran variedad de formas, aunque su función no es del todo conocida, una de las funciones propuestas es la sensorial por quimiotáxis. En el disco oral, por encima y debajo de la boca, presenta vainas queratinosas sobre la mandíbula (rostrodontes) los cuales conforman un pico córneo que se utilizan para cortar el alimento. También hay filas paralelas de dientes labiales queratinosos denominados queratodontes, los que actúan como raspadores

para extraer alimentos y materia orgánica adherida a sustratos sumergidos. Dorsalmente, entre el hocico y los ojos, se encuentran las narinas. El diámetro y la forma de las narinas varían según la especie y puede tener un ligero borde o papilas las cuales son menos frecuentes. Los ojos son expuestos y carecen de párpados. El tamaño, orientación y posición de los ojos son caracteres útiles empleados en la identificación de especies, estos pueden ubicarse dorsalmente, dorso lateral o lateralmente. Las branquias, se desarrollan externamente en los primeros estadios del desarrollo, generalmente son tres pares que se proyectan desde el exterior de los arcos branquiales. En el desarrollo las mismas son recubiertas por un opérculo que crece desde la parte posterior de la cabeza y se fusiona con el tronco, y culmina su crecimiento encerrando las branquias y las extremidades anteriores en desarrollo. Al costado del cuerpo, aunque con posición variable, presentan una estructura tubular denominada espiráculo a través de la cual evacuan el agua de la cámara bucofaringea después de haber sido bombeada y circulada a través de la boca y las branquias. Esta estructura puede ser única o doble, ubicándose en este último caso a ambos lados del cuerpo.

En la región posterior del cuerpo se ubican los sistemas de órganos vitales. El sistema digestivo ocupa la mayor cantidad del espacio desembocando en el tubo o abertura anal que se ubica en la región posterior de cuerpo. La cola utilizada como propulsora en la natación se compone de musculatura central, soportada internamente por una notocorda libre de vértebras y rematada dorsal y ventralmente por aletas de tejido conectivo cubierto por epidermis. La piel consta de dos capas epidérmicas, es delgada y está muy vascularizada en relación con su papel en la respiración.

El esqueleto puede ser total o principalmente cartilaginoso y el sistema de línea lateral se encuentra bien desarrollado.

Entre las numerosas clasificaciones propuestas para clasificar a las larva (Mann, 1999) consideran el origen de la fuente de energía utilizada para las primeras etapas del desarrollo (endotróficas y exotróficas) y dentro del grupo exotrófico llega a reconocer 15 gremios según el hábitat, la morfología general del renacuajo (cuerpo y cola, posición del ojo, aparato oral) y su alimentación. Por ejemplo, las larvas con tipo de hábitat pelágico son de cuerpo comprimido lateralmente y aletas en general bien desarrolladas, características que en general se contraponen a las de larvas de hábitat bentónico, que presentan cuerpo deprimido y aletas de menor desarrollo. De este modo para cada hábitat y comportamiento, se han descrito diversos morfotipos denominados “tipos ecológicos”.

2.1.3 Descripción del desarrollo normal

Debido a que las larvas de anuros constituyen una fase efímera del ciclo de vida, y presentan una gran variabilidad entre especies, para facilitar su descripción se emplean tablas normalizadas para ordenar el desarrollo en estadios. Estas tablas utilizan referencias morfológicas comunes para describir, comparar y secuenciar los eventos que ocurren durante

el desarrollo. Actualmente existen más de 45 tablas de desarrollo para diferentes especies, siendo las más utilizadas (Nieuwkoop & Faber, 1967; Shumway, 1940; Taylor & Kollros, 1946). Gosner (1960) (EG) estandarizó la información con fines comparativos y presentó una tabla simplificada, adecuada para ordenar series de desarrollo generalizadas en 46 estadios discretos. El sistema propuesto resultó sumamente exitoso, y su aceptación se materializó en su uso extendido en un gran número de estudios, ya que permite comparaciones interespecíficas por lo que creemos apropiada su utilización en esta tesis para la descripción de los estadios de desarrollo de las especies utilizadas.

Como mencionamos anteriormente, los avances en el estudio del desarrollo larval en anuros han permitido caracterizar las etapas, los estadios y describir en detalle los eventos que guían la formación de las capas germinales, la gastrulación, la neurulación (Keller, Davidson, & Shook, 2003; Shook & Keller, 2003) e incluso establecer los momentos en los que se comienza a formar cada órgano y los sistemas que componen (Blitz, Andelfinger, & Horb, 2006). El estudio en detalle ha permitido generar mapas completos de linaje celular, los cuales permiten determinar el destino preciso para las primeras blastómeras (32 células) y el patrón mitótico que dio origen a ese destino (Moody, 1987a, 1987b; Moody & Kline, 1990).

Para su estudio, el desarrollo ontogenético puede ser subdividido en dos periodos, el embrionario y el larvario. El período embrionario se inicia con la fecundación del oocito y se extiende hasta el momento en que el embrión comienza la alimentación activa, mientras que el período larvario parte de este punto hasta que se completa la metamorfosis, con la reabsorción del último vestigio de cola. Si bien existe una gran variabilidad en cuanto al momento del desarrollo en el que las larvas comienzan a alimentarse, muchos autores, entre ellos Gosner (1960) indican al estadio 25 como el estadio más frecuente en el que las larvas comienzan a alimentarse libremente.

De manera resumida el desarrollo embrionario puede ser descrito de la siguiente manera. Luego de la fecundación, se produce la segmentación con dos divisiones meridionales iguales. La primera división ecuatorial ocurre desplazada hacia el polo animal, por lo que se produce una desigualdad en el tamaño de los blastómeros de los polos (segmentación holoblástica desigual), formando micrómeros y macrómeros. (Herkovits, 1977) El embrión continúa experimentando divisiones mitóticas, sin aumento significativo en el tamaño ni cambios en su forma esférica, pasando por diferentes estadios en los que predomina la división celular. Como consecuencia de la segmentación se forma la blástula con blastocele y por lo menos dos capas celulares más desarrolladas en el polo vegetativo. Las células comienzan a desplazarse hacia el interior del embrión quedando determinadas las capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), proceso denominado gastrulación. A partir de las capas germinales se formarán los futuros órganos y tejidos (Gilbert & Epel, 2009). Posteriormente ocurre la neurulación que culmina con la formación del tubo neural y el incipiente sistema nervioso del embrión. Juntamente con la neurulación, el embrión va

adquiriendo simetría bilateral y comienza a elongarse. Los embriones eclosionan de la membrana vitelina y posteriormente adquieren movimientos mediante contracciones musculares. En los sucesivos estadios el cuerpo comienza a alargarse y a diferenciarse la forma típica distinguiéndose el cuerpo y la cola.

Posteriormente comienza a funcionar el sistema cardiovascular, se abre la boca y se forma la cámara opercular, las branquias pasan a ser internas, alcanzando de esta forma el estadio 25 de desarrollo (EG). En gran parte de las especies, a partir de esta etapa del desarrollo se pasa a la vida larvaria, caracterizada por el movimiento activo, la vida libre y la natación. Esta actividad facilita la búsqueda de alimento y, mediante su consumo, la larva crece en tamaño y se desarrolla en sus rasgos propios y en aquellos relativos al proceso de metamorfosis hacia la forma adulta. Tanto la tasa de crecimiento como la de desarrollo resultan variables, dependiendo de las condiciones ambientales, como ser la disponibilidad de recursos, el fotoperiodo, la cantidad de agua (profundidad) y la biomasa de la biota entre otros.

La mayoría de los autores coinciden en dividir al periodo metamórfico en 2 etapas: prometemorfosis y climax o crisis metamórfica. La primera comprende el momento de la aparición de los miembros anteriores y la segunda etapa comprende los cambios más notables y rápidos que conducen a la forma juvenil. (Etkin & Gona, 1967; Gosner, 1960)

Los cambios que sufren los organismos durante la metamorfosis son, en parte progresivos (órganos nuevos o modificación de los ya existentes) y en parte regresivos (reducción o desaparición completa de órganos).

Los procesos constructivos se relacionan con todas aquellas características que serán propias de la forma adulta: el desarrollo progresivo de las extremidades, cuyo tamaño y grado de diferenciación aumentan; el desarrollo del oído medio; el desarrollo de la membrana timpánica; la formación de los párpados y el sobre salimiento de los ojos en la superficie dorsal de la cabeza y el desarrollo de la lengua (Balinsky, 1983).

Los órganos que funcionan en la larva, pero se transforman durante la metamorfosis son principalmente, la piel y el intestino. La piel del renacuajo está cubierta por una epidermis en bicapa. Durante la metamorfosis aumenta el número de capas de células y las células superficiales constituyen el estrato córneo. Se forman glándulas y varía la pigmentación.

El intestino en los renacuajos, mayormente de dieta omnívora, se acorta y la mayor parte de las asas propias de la larva se convierten en tramos rectos. Es interesante destacar que los pulmones no experimentan cambios drásticos durante la metamorfosis, desarrollándose gradualmente

Los procesos regresivos que ocurren durante la metamorfosis son la reabsorción de cola, branquias y cámara branquial. Los queratodontes y el pico corneo se desprenden, el tubo

cloacal se acorta y reduce, se reestructura el sistema circulatorio y los órganos de la línea lateral, existentes en la piel de los renacuajos, desaparecen en la mayoría de las especies.

Los cambios morfológicos que ocurren durante la metamorfosis se presentan junto con cambios fisiológicos. Los más notables son el inicio de la función endócrina del páncreas en relación con una mayor intervención hepática en la síntesis de urea, lo que resulta en un cambio en el mecanismo excretor (Munro, 1939).

Las tasas de crecimiento, desarrollo y supervivencia de las larvas de anuros se encuentran relacionadas entre sí y a su vez están influenciadas por varios factores. Estos factores pueden ser identificados como primarios (Factores bióticos o ambientales) o secundarios. Estos últimos operan a través de la ecología reproductiva y el comportamiento de los adultos, mediante la selección de sitios de puesta, lo que afecta directamente el ambiente de las larva, tal como se muestra en la Figura 2.2 (Alford & Richards, 1999)

En lo que respecta a las tasas de crecimiento los factores que más influyen son, la competencia, la cual puede ser tanto intra como interespecífica y los factores ambientales, que describen la calidad del agua como ser oxígeno disuelto, pH, así como también factores físicos como la temperatura y el fotoperíodo (Loman, 2016; Wijethunga, Greenlees, & Shine, 2015; Woolrich-Piña, Smith, & Lemos-Espinal, 2015).

Las tasas de desarrollo pueden estar influenciadas por los factores ambientales nombrados previamente o también por señales intrínsecas como la tasa de crecimiento y los umbrales del tamaño corporal, así como también por interacciones intra e interespecíficas.

La supervivencia puede ser directamente afectada por la depredación e indirectamente por la tasa de crecimiento ya que los renacuajos que presentan crecimientos más rápidos a menudo llegan a la metamorfosis antes que los individuos de crecimiento lento y, por lo tanto, experimentan tasas de mortalidad más bajas. Además, la supervivencia se ve afectada por factores ambientales bióticos y abióticos (Boone, Semlitsch, Little, & Doyle, 2007; Govindarajulu & Anholt, 2006)

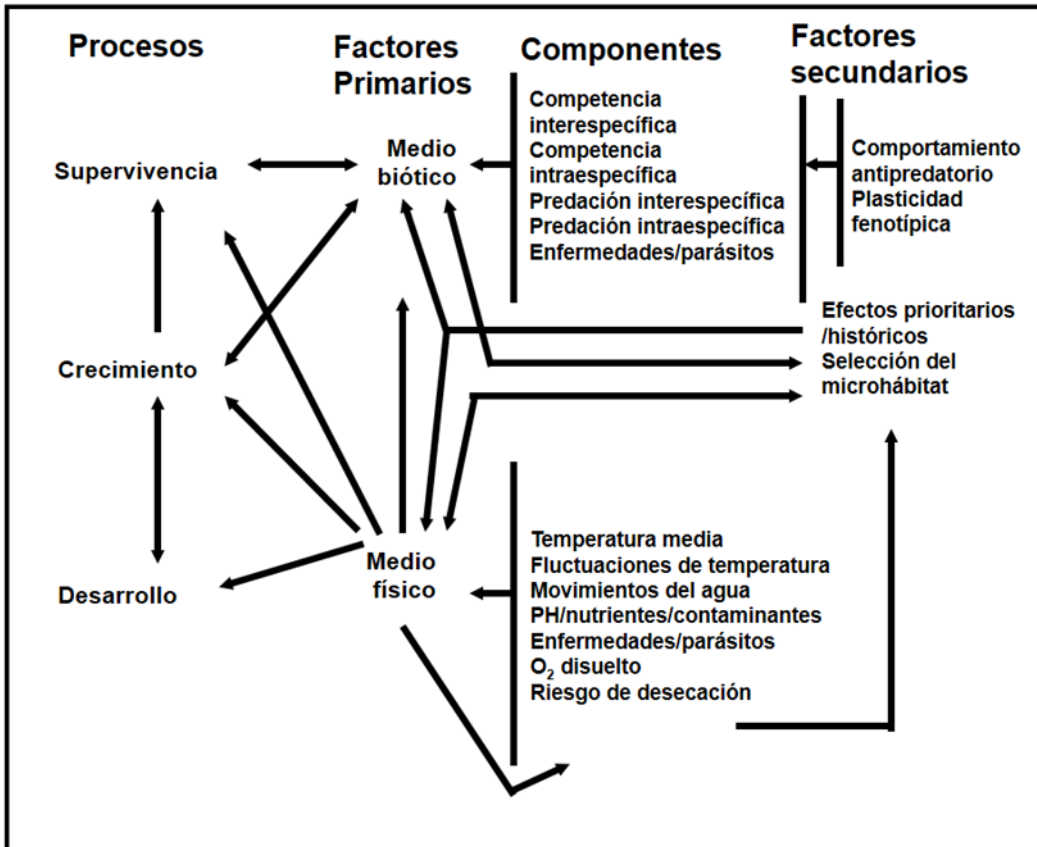


Figura 2.2 Resumen de los factores que influyen sobre los procesos de vida de las larvas de anfibios. (Tomado de Mann 1999).

Como producto de numerosos trabajos realizados en el campo de la ecología de larvas de anuros, (Wilbur & Collins, 1973) propusieron un modelo teórico que explica los factores que influyen sobre los procesos de desarrollo, crecimiento y supervivencia de larvas, además de las relaciones entre ellos (Figura 2.3). Los autores señalan que las tasas de desarrollo y metamorfosis de individuos de la misma especie a menudo varían ampliamente dentro de un ambiente físico dado. Esto consistiría en una ventaja evolutiva conferida a las especies que son capaces de ajustar sus tasas de desarrollo en respuesta a su tasa de crecimiento.

De forma resumida, estos autores sugieren que, si las condiciones resultan favorables para las larvas, estas presentarán un crecimiento rápido, asociado con una disminución en la tasa de desarrollo llegando a la metamorfosis con un gran tamaño corporal. Por el contrario, si las condiciones acuáticas fueran desfavorables, las larvas acelerarán su tasa de desarrollo llegando a la metamorfosis con tamaños corporales pequeños (incluso mínimos para cada especie), continuando su crecimiento en la etapa terrestre y supeditada a poseer un menor fitness o performance, siendo esto un riesgo para la supervivencia. Por ejemplo, ha sido ampliamente documentado que las larvas criadas a altas densidades y alimentadas *ad libitum*

presentan menor tamaño al llegar a la metamorfosis respecto de larvas criadas a baja densidad con mismas disponibilidades de recursos (alimento) (Brockelman, 1969; Denver et al., 1968; Laufer y Maneyro 2008). Esto es debido a que a baja densidad o alta disponibilidad de recursos la competencia es menor, la mayoría de los individuos crece a tasas mayores y retrasan la tasa de desarrollo, alcanzando la metamorfosis con tamaño mayor. Por el contrario si el desarrollo ocurre a mayores densidades bajos recursos, los individuos crecen lentamente y llegan a la metamorfosis con tamaños corporales pequeños (mínimo tamaño necesario según este modelo). Las larvas restantes tendrían de esta forma más recursos disponibles lo cual les permitiría crecer rápidamente y retrasar su metamorfosis hasta alcanzar tamaños corporales ligeramente más grandes. Este proceso permitiría a los individuos restantes lograr tasas de crecimiento que permitan obtener un mayor tamaño llegada la metamorfosis (Collins & Wilbur, 1979).

Tal como propone este modelo los rangos de tamaño corporal y la duración de la metamorfosis estarían determinados por un tamaño corporal mínimo que debe obtenerse para lograr la metamorfosis y un tamaño corporal máximo (optimo) a la metamorfosis. Entre estos dos límites umbrales de tamaño corporal, se espera que el inicio de la metamorfosis esté relacionado con las tasas de crecimiento de las larvas, las cuales a su vez se verán influenciadas por las condiciones ambientales a las cuales están expuestas las larvas. De esta forma, las especies que explotan ambientes inestables tendrán una mayor variabilidad de tamaños posibles a la metamorfosis a diferencia de aquellas especies que viven en entornos relativamente estables, las cuales tendrán tamaños a la metamorfosis más homogéneos (Wilbur & Collins 1973).

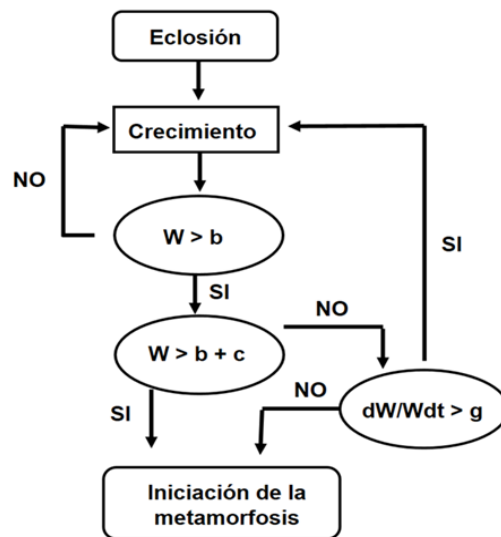


Figura 2.3. Modelo de Wilbur-Collins relaciona las tasas de crecimiento y desarrollo. Abreviaturas: b = tamaño mínimo para la metamorfosis; c = diferencia entre el tamaño corporal mínimo y máximo para la metamorfosis; g = tasa de crecimiento específica por debajo de la cual se inicia la metamorfosis, por encima de la cual se retrasa la metamorfosis; y W = masa corporal. Después de Cohs (1979). (Tomado de (McDiarmid & Altig, 1999).

2.1.4 Alteraciones en el desarrollo larval

Durante el desarrollo larval, tal como se describió anteriormente, ocurre un proceso denominado morfogénesis, el cual se caracteriza por una serie consecutiva de divisiones, migraciones, diferenciaciones y muertes celulares programadas que son guiadas por mapas genéticos bien definidos (Gilbert & Epel, 2009). A través de este proceso se van formando los tejidos que determinan el Bauplan de los individuos y la correcta funcionalidad de los órganos y sistemas (Cock, 1966), lo cual condicionará la morfología larval. Esta etapa resulta crítica para la supervivencia y el desarrollo normal de los individuos ya que cualquier cambio relativamente pequeño en el desarrollo temprano puede tener efectos profundos en la expresión del fenotipo (Gans, 1985).

Los anuros, durante su desarrollo, además de pasar por esta etapa crítica de gran susceptibilidad a cambios en el ambiente, experimentan otros cambios no menos importantes que condicionan su sensibilidad. Las larvas sufren un cambio de medio al abandonar la protección y la homeostasis que le brindan las membranas del huevo (medio interno) y eclosionan a un medio externo menos estable y adverso a la vez que comienzan a alimentarse, a interactuar de manera más compleja con el medio y con los estresores ambientales. Esta etapa larval de vida libre se prolonga por un periodo relativamente largo hasta que comienza la metamorfosis. La metamorfosis constituye otra etapa significativa de sensibilidad, ya que durante la metamorfosis las larvas se ven afectadas por cambios morfológicos significativos, nombrados previamente, siendo más susceptibles (menos plásticas) a sufrir alteraciones durante esta etapa.

Por los argumentos presentados, es esperable que las alteraciones ocurridas en estas tres etapas sensibles (desarrollo embrionario, eclosión y metamorfosis), provoquen efectos sobre las etapas de vida posteriores pudiendo derivar en patologías o incluso la muerte de los organismos (Sparling, Linder, Bishop, & Krest, 2010).

Considerando esto, el presente plan de tesis propone que cualquier cambio provocado por un estresor (natural o artificial) ocurrido en estas etapas tendrá como consecuencia un efecto que puede provocar alteraciones en el normal desarrollo de los individuos, el desarrollo de patologías subletales e incluso la muerte de los individuos.

Tal como define Johnson *et al.* (2010): “cualquier desviación grave de los límites normales en morfología” constituye una anomalía, este término general incluye a las malformaciones que son alteraciones que ocurren por un desarrollo anormal resultando en defectos estructurales permanentes, y distingue de estas a las deformidades como alteraciones de un órgano o estructura que se formó correctamente.

En condiciones normales, las anomalías poseen una tasa de ocurrencia espontánea baja, dentro de un rango del 2 % (Ouellet, 2000), pero el aumento en su frecuencia de ocurrencia

se puede asociar con el efecto provocado por diferentes factores de estrés, tal cual lo define Michael Newman (2012) en su libro “Quantitative Ecotoxicology”.

La ocurrencia y el tipo de anomalía provocado por factores de estrés dependen del momento del desarrollo en el cual ocurre la interacción y acción del estresor (además de la magnitud del estímulo y el tiempo de exposición), tal como se describió anteriormente, mientras más temprano en el desarrollo ocurran los eventos de interacción más graves serán los efectos. Siguiendo este razonamiento, se puede deducir que una vez ocurrida una anomalía se podría determinar el momento del desarrollo aproximado en el cual ocurrió el daño, por ejemplo, si la malformación es un órgano incompleto, el factor o la agresión debe haber ocurrido durante un período susceptible anterior a la formación completa de ese órgano (Hood, 2005). Los estresores ambientales también influyen sobre el tipo de anomalía, es decir un mismo estresor que actúa en diferentes etapas del desarrollo ocasionará diferentes tipos de anomalías. Por otra parte, diferentes estresores que ejerzan acción en la misma etapa de desarrollo pueden ocasionar alteraciones en el desarrollo que causen una misma malformación (Riley & Vorhees, 2012).

Por lo tanto, el hecho de que los anfibios sean animales considerados como indicadores de calidad del ambiente por su sensibilidad y las características descritas anteriormente, y que la ocurrencia de anomalías se pueda asociar como un efecto ocasionado por un factor de estrés, da lugar a la propuesta de los principales objetivos del presente trabajo de tesis que es evaluar la presencia de anomalías en anuros como indicadores de efecto producido por estresores ambientales y en particular la contaminación.

Si bien las anomalías en anuros han sido estudiadas desde hace tiempo, la disminución numérica de anfibios a nivel global (Stuart et al., 2004), junto con la preocupación por el deterioro ambiental y el descubrimiento de poblaciones de anuros con anomalías (Burkhart et al., 2000; M. Lannoo, 2008; M. J. Lannoo, 2009) han renovado el interés en el estudio de anomalías en anfibios. Los avances producidos como consecuencia de estas investigaciones han permitido considerar a los anuros como indicadores de la calidad del ambiente y de perturbaciones ambientales (Burkhart et al., 2000; Vershinin, Vershinina, Berzin, Zmeeva, & Kinev, 2015).

Los diferentes aportes logrados han sido incorporados en distintas revisiones (K Henle, 2014; Klaus Henle & Dubois, 2017; Ouellet, 2000). La revisión más reciente (Klaus Henle & Dubois, 2017) sintetiza la información disponible de estudios sobre anomalías externas reportadas en poblaciones de anfibios en la naturaleza. En este trabajo se discuten las posibles causas de ocurrencia de las anomalías, entre las que destacan la presencia de parásitos (Johnson, Lunde, Haight, Bowerman, & Blaustein, 2001; Lunde & Johnson, 2012; Roberts & Dickinson, 2012), la contaminación química (Fort, Rogers, McLaughlin, Sellers, & Schlekot, 2002; Skelly & Benard, 2010) y las enfermedades emergentes (Barrionuevo, Aguayo, & Lavilla, 2008; Berger et al., 2016). Estas mismas causas son identificadas por

otros autores, los que incorporan la radiación UV (Blaustein, Romansic, & Scheessele, 2005; Habaeva, Gazzaeva, Badtiev, & Gagloeva, 2016). Por lo antedicho podemos afirmar que el estudio de las anormalidades ocurridas en poblaciones naturales cuenta con una buena base de información, la que fue aumentando con el tiempo. A pesar de ello la mayor parte de los trabajos se centran en anormalidades ocurridas en anuros adultos para las cuales se han confeccionado guías útiles para identificar las anormalidades halladas (M. Lannoo, 2008; Lunde & Johnson, 2012; Meteyer, 1997)

Si analizamos la información proveniente de estudios ecotoxicológicos en relación con la ocurrencia de anormalidades, vemos que existen numerosos reportes realizados desde hace más de 50 años que describen la ocurrencia de anormalidades en larvas provocadas por la exposición a diferentes compuestos puros, pudiendo mencionar entre las más recientes (Agostini, Natale, & Ronco, 2010; Carolina Mariel Aronzon, Marino, Ronco, & Coll, 2014; Brunelli et al., 2009; G. V. Svartz, Aronzon, & Perez Coll, 2016). Entre los estudios realizados pueden distinguirse: a) aquellos que realizan exposiciones a corto plazo en embriones, como los realizados aplicando los procedimientos propuestos para evaluar teratogénesis (FETAX) (J. Bantle, 1995; Burkhart et al., 2000; De Lapuente, González-Linares, Pique, & Borràs, 2014) y bioensayos de toxicidad con embriones de *Rhinella arenarum* AMPHITOX (Herkovits & Pérez-Coll, 1999) o b) Bioensayos que evalúan puntos finales en las etapas de renacuajo o a través de la metamorfosis (Nadia Carla Bach, Natale, Somoza, & Ronco, 2016; Britson & Threlkeld, 1998; Brunelli et al., 2009; Guillermo Sebastian Natale et al., 2018; G. Svartz, Meijide, & Coll, 2016; G. V. Svartz, J. Herkovits, & C. S. Pérez-Coll, 2012). En dichos trabajos se describan las anormalidades de manera aislada utilizando en algunos casos el atlas de anormalidades de Bantle (1991).

Finalmente, del análisis de la información existente se desprende que los trabajos sobre ocurrencia de anormalidades en larvas de campo son escasos y hay pocas guías para identificar y describir dichas anormalidades (Bantle 1991, por ej.).

Esta información, como producto de hallazgos publicados en el contexto de numerosas y diversas disciplinas científicas, ha generado una gran heterogeneidad en las descripciones, clasificaciones y denominaciones de las anormalidades que reportan, al realizar una revisión detallada, se hace evidente, la necesidad de establecer una unificación de la nomenclatura utilizada para las anormalidades ocurridas en larvas.

Considerando lo antedicho el presente plan de trabajo analiza los caracteres morfológicos que resultan frecuentemente afectados en larvas de anuros autóctonas expuestas a contaminantes ambientales.

Para ello se presenta, como base necesaria para una adecuada interpretación, una descripción de la anatomía morfológica normal de las especies estudiadas y, en base a ella, una descripción y tipificación de las alteraciones morfológicas presentes en larvas de anuros

expuestas a contaminantes de referencia, para luego, considerando la información e interpretando todo en un contexto ecotoxicológico actual, evaluar la utilidad de su empleo como biomarcadores a ser utilizado en estudios ecotoxicológicos.

Hipótesis

1. La información proveniente de la cría y mantenimiento de larvas en laboratorio permiten establecer valores normales de referencia.
2. Los factores de estrés (físico, químico y biológico) afectan las características morfológicas de las larvas provocando el desarrollo de anomalías.
3. Las anomalías son útiles como puntos finales de evaluación.

Objetivos

1. Describir cualitativa y cuantitativamente la morfología larvaria de *Boana pulchella* y *Rhinella arenarum* a partir de un conjunto de caracteres morfológicos externos a lo largo del desarrollo en condiciones controladas de laboratorio.
2. Describir cualitativa y cuantitativamente las tasas de crecimiento, desarrollo y supervivencia de larvas de ambas especies en condiciones controladas de laboratorio.
3. Identificar y cuantificar, a partir de datos propios provenientes de estudios ecotoxicológicos, la presencia y frecuencia de anomalías en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a contaminantes ambientales.
4. Realizar una revisión exhaustiva y detallada de las publicaciones de índole ecotoxicológicas en donde utilicen anomalías como puntos finales.
5. Realizar mediante la información proveniente de los objetivos anteriores una lista de anomalías con unificación de terminología.
6. Aportar evidencias que permitan proponer la presencia de anomalías en larvas de anuros como punto final de evaluación en el contexto ecotoxicológico.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el primer objetivo se procedió a coleccionar puestas de poblaciones de ambas especies que habitan en ecosistemas con bajo grado de perturbación (sitios de referencia, ver Capítulo 1). Las mismas se trasladaron al laboratorio y se criaron en las condiciones establecidas de cría considerando estudios previos realizados en el laboratorio y datos de la bibliografía.

Por otra parte, esas mismas cohortes fueron empleadas para obtener muestras en estadio 30-32, a las cuales se les tomó medidas y se observó su morfología en detalle a fin de emplearlas como material de referencia. (Objetivo 2).

Para realizar el tercer objetivo se observaron bajo lupa un grupo de larvas expuestas a diferentes contaminantes ambientales, observando y cuantificando la presencia de anomalías y se realizó una revisión bibliográfica de trabajos ecotoxicológicos que informaran la presencia de anomalías en anuros (Objetivo 4) Por último con la información obtenida de los objetivos a y b se propuso una lista, descripción y grado de severidad de las anomalías comúnmente reportadas para larvas de anuros (Objetivo 5).

2.2.1 Colecta de huevos y mantenimiento en laboratorio

La obtención de huevos se realizó por recolección directa de puestas en los sitios de referencia (Ver Capítulo 1). Una vez detectadas e identificadas las puestas se procedió, provocando la menor perturbación posible, a introducir una porción de la puesta (10% del total) junto con el agua circundante y, de ser necesario vegetación asociada, para su posterior traslado al laboratorio en una bolsa de polietileno.

Una vez en laboratorio, las puestas fueron colocadas en bateas plásticas de 45 L donde fueron mantenidas en las siguientes condiciones controladas: Fotoperíodo de luz:oscuridad (16:8h); Agua de bioensayo (agua de red previamente filtrada por filtro físico Aqua-Pure® de 5 µ Modelo AP-110 H/C y aireada por 48 h enérgicamente con el objetivo de eliminar el cloro); Temperatura aire-agua (25 ± 1 °C); pH ($7,6 \pm 0,1$); Oxígeno disuelto ($7,7 \pm 0.3$ mg/l); Conductividad (1025 ± 15 µS/cm); dureza (181 ± 35 mg/l CaCO₃); aireación por burbujeo con bomba aireadora constante (90 burbujas/min). Cuando los embriones alcanzaron el estadio 18 (EG), se realizaron tareas de limpieza y mantenimiento a las bateas retirando restos de la cubierta gelatinosa y restos de donde estaban inmersos los huevos, así como también se retiraron los huevos no fecundados y embriones que no se desarrollaron. Cuando las larvas llegaron al estadio 25 (EG), se separaron en bateas en densidad de 10 individuos por litro (450 larvas/45L) y se les suministró como fuente de alimento 1 g de escamas para peces (TetraMin®, Tetra Werke, Alemania o Shulet®Carassius, Shulet S.A, Argentina), cuatro veces por semana (Kehr 1987, 1989 Natale 2006). Esta situación se mantuvo hasta la metamorfosis.

2.2.2 Descripción de larvas normales

Para determinar las tasas de crecimiento, desarrollo y supervivencia se utilizaron las larvas criadas en laboratorio a partir de huevos traídos de los sitios de referencia y mantenidos según los métodos explicados en el inciso anterior. Se tomaron muestras de cinco individuos al azar en diferentes estadios del desarrollo. Dichos individuos fueron colectados cuando se observaba un aumento significativo en el tamaño de los individuos y un consecuente cambio en el desarrollo. Luego de su extracción los individuos fueron anestesiados con Tricainametanosulfonato (MS-222) y fijados en formaldehído 10%.

Posteriormente se determinó, para cada individuo, el estadio de desarrollo de acuerdo con la calificación propuesta por Gosner (1960) y se observó la morfología externa, empleando para ambos casos una lupa estereoscópica marca Ahecro (modelo ZTX-3). La longitud total (según McDiarmid y Altig 1999) se midió empleando fotografías digitales como registro, con cámara fotográfica marca Samsung WB850F y herramientas del programa ImageJ® versión 1.46r (Rasband, Instituto Nacional de Salud, EEUU de América). El peso de cada individuo se determinó utilizando una balanza digital de precisión 0,001 gr.

Con el fin de describir las características morfológicas larvales de las dos especies de estudio se seleccionaron, del conjunto de larvas previamente fijadas, 10 larvas en estadios de desarrollo 30-32 (EG) de cada especie, considerados como estadios representativos de la forma larval. A cada uno de los individuos seleccionados se le realizaron las siguientes mediciones: (a) Longitud del cuerpo, (b) Longitud de la cola, (c) Distancia extraocular, (d) Distancia intraocular, (e) Ancho del cuerpo, (f) Longitud total, (g) Diámetro del ojo, (h) Ancho de la musculatura de la cola, (i) Ancho del disco oral. (Figura 2.4).

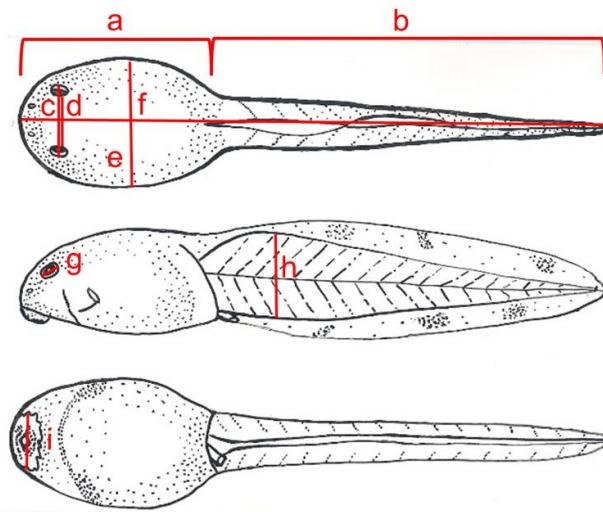


Figura 2.4. Medidas lineales tomadas: a- Longitud del cuerpo, b- Longitud de la cola, c- Distancia extraocular, d- distancia intraocular, e- Ancho del cuerpo, f- Longitud total, g- Diámetro del ojo, h- Ancho de la musculatura de la cola, i- Ancho del disco oral.

2.2.3 Análisis de larvas anormales

Análisis de muestras de larvas de bioensayos

Se realizó un estudio comparativo de las anomalías presentes en larvas de *Rhinella arenarum* procedentes de bioensayos previos (Natale *et al.*, 2008) los cuales habían sido expuestos a 10 contaminantes de relevancia ambiental: Cipermetrina (CY), Clorpirifos (CP), Endosulfán (EN), Glifosato (GL), Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Plomo (Pb) y Zinc (Zn). Las larvas (n=300) habían sido expuestas en estadio 25 por 96 horas

a diferentes concentraciones de los contaminantes nombrados y a un control con agua de ensayo. Una vez finalizado el experimento, las mismas fueron fijadas en formol 10%.

Cada larva fue observada bajo lupa estereoscópica Ahecro (modelo ZTX-3) para determinar el estadio de desarrollo y la presencia de anormalidades. Se realizó una primera lista conformada por 20 tipos de anormalidades, las cuales fueron identificadas, cuantificadas y clasificadas considerando publicaciones preexistentes y evaluadas como posibles indicadores. Posteriormente, para realizar comparaciones de los resultados obtenidos en los bioensayos con los diferentes contaminantes, las anormalidades presentes se agruparon en 6 categorías: 1) Anormalidades presentes en la cola 2) Cuerpo hinchado, 3) Despigmentación del cuerpo, 4) Intestino anormal, 5) Edemas (cuerpo y cola) y 6) Anormalidades en el disco oral.

Las larvas que presentaban anormalidades relevantes fueron separadas en frascos individuales fotografiadas y guardadas para realizar análisis detallados incorporando otras técnicas.

Análisis bibliográfico

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva de publicaciones en el ámbito de la Ecotoxicología que informaran sobre la presencia de anormalidades en larvas de anuros en campo y en laboratorio como consecuencia de exposición a contaminantes ambientales. La búsqueda se sistematizó empleando los siguientes buscadores: Scopus; Scielo y Google Académico, empleando sistemáticamente las palabras “Anura” “Amphibian” “Tadpole” “Abnormalities” “Malformation” “Deformation” en diferentes combinaciones, buscando estas palabras en el título, palabras claves y en el resumen, además se amplió revisando en detalle la bibliografía citada en los trabajos encontrados.

Lista de anormalidades

Con la información obtenida del análisis de las anormalidades presentes en larvas de *Rhinella arenarum* procedentes de bioensayos previos más los resultados de la revisión bibliográfica se realizó un análisis crítico, ordenando, clasificando e interpretando la información recopilada. Una vez integrada la información, se realizaron comparaciones entre las descripciones y clasificaciones preexistentes buscando identificar patrones comunes, así como también detectar diferencias, desacuerdos y contradicciones, para finalmente proponer una lista de nomenclatura unificada acompañada de una descripción de las anormalidades y una valoración del grado de severidad, la cual se realizó considerando si las mismas afectan la supervivencia, alimentación, movilidad o mimetización de los individuos. Estas anormalidades fueron consideradas significativas y relevantes al momento de evaluar factores de estrés (en particular exposición a contaminantes) sobre larvas, vinculadas con efectos subletales que adviertan riesgo en la supervivencia de los individuos.

2.2.4. Análisis de datos

Los datos obtenidos en las diferentes actividades realizadas, fueron analizados mediante estadística descriptiva, con el objetivo de conocer la distribución de los datos, y describir su comportamiento. Se construyeron tablas y gráficos para su presentación. Con los datos de Longitud total (mm), estadio de desarrollo y registros de supervivencia se construyeron curvas de crecimiento, desarrollo y supervivencia para ambas especies. Mediante análisis de regresión y correlación se estimaron las tasas de supervivencia, crecimiento y desarrollo.

Los datos de presencia y frecuencia de ocurrencia de anomalías registradas en cada bioensayo fueron explorados mediante estadística descriptiva analizados mediante ANOVA con prueba posteriori de Dunnett para determinar diferencias significativas entre las diferentes concentraciones y el grupo control ($\alpha=0,05$).

Complementariamente, la frecuencia de ocurrencia de cada anomalía en cada uno y en la totalidad de los bioensayos se exploró mediante estadística descriptiva, se realizaron comparaciones con pruebas de significancia tales como test de bondad de ajuste y tablas de contingencia.

Finalmente, con la intención de describir el comportamiento del conjunto de anomalías analizadas, conocer el grado de relación entre la totalidad de las variables y detectar patrones de respuesta se aplicó un análisis de componentes principales.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Descripción de larvas normales

El mantenimiento en laboratorio de larvas de *R. arenarum* y *B. pulchella* resultó sencillo y exitoso. Ambas especies pudieron ser mantenidas desde huevo hasta la metamorfosis en las condiciones descritas en la metodología, sin mayores dificultades.

Los resultados obtenidos muestran un alto porcentaje de supervivencia siendo del 77 % para *R. arenarum* y 93,67 % para *B. pulchella*, desde el estadio 0 (EG) hasta el estadio 42 (EG) (inicio de metamorfosis). Específicamente, se pudo observar que el tiempo total de desarrollo desde la fase de huevos (EG0) hasta iniciar la metamorfosis (EG42), fue de 70 ± 6 días para *R. arenarum* y 120 ± 7 días para *B. pulchella*. Las tasas de desarrollo y crecimiento para *R. arenarum* fueron 0,168 y 0,159 respectivamente, y para *B. pulchella* 0,11 y 0,16 respectivamente. En la Figura 2.5 se muestran las rectas de crecimiento y desarrollo en condiciones controladas de laboratorio para cada especie.

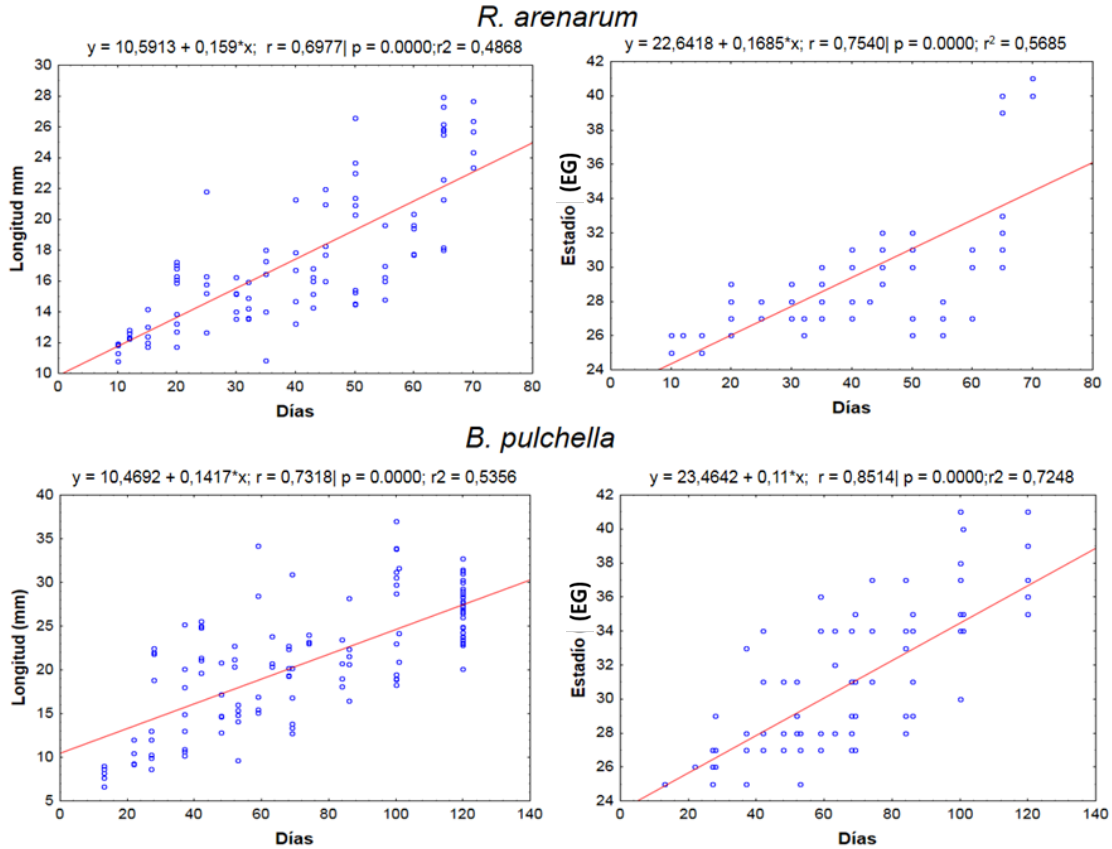


Figura 2.5 Rectas de crecimiento y desarrollo para ambas especies.

Los resultados permitieron estimar la longitud total promedio para cada estadio de desarrollo larvario en ambas especies: siendo para *R. arenarum* de $13,20 \pm 2,04$ mm en EG(25-26); $15,59 \pm 1,86$ en EG(27-29); $20,06 \pm 2,95$ mm en EG(30-32); $25,70 \pm 2,33$ mm en EG(33-36) y $2,49 \pm 1,49$ mm en EG(37-42) y para *B. pulchella* de $10,06 \pm 2,51$ mm en EG(25-26); $17,43 \pm 3,21$ en EG(27-29); $21,44 \pm 1,85$ mm en EG(30-32); $25,73 \pm 2,33$ mm en EG(33-36) y $30,01 \pm 3,14$ mm en EG(37-42). Los análisis de regresión corroboraron que durante el desarrollo larval de ambas especies la longitud total aumenta significativamente conforme aumenta el tiempo y las larvas avanzan en el estadio de desarrollo ($r = 0,89$; $p < 0,0001$) para *B. pulchella* y ($r = 0,86$; $p < 0,0001$) para *R. arenarum*.

En cuanto a la ocurrencia de anomalías, las larvas de *B. pulchella* presentaron una prevalencia de individuos anormales del 0,2%, mientras que para *R. arenarum* la prevalencia fue del 0,5%, en ambos casos estas prevalencias fueron inferiores a los valores basales (5%) propuestos por Read JL (1997).

Descripción de caracteres

Las mediciones de las larvas de ambas especies en las etapas de desarrollo 30-32 EG se muestran en la Tabla 2.1. La morfología externa se muestra en la Figura 2.6. A continuación

se realiza la descripción de las larvas, considerando los promedios y desvíos estándar de las variables medidas.

Las larvas de *R. arenarum* son del tipo IV, exotróficas, lénticas y bentónicas. Tamaño pequeño, longitud total 22,01 mm ($\pm 2,19$), longitud del cuerpo (8,08 $\pm 1,01$); presentan cuerpo romboide con un ancho de 4,5 mm $\pm 0,7$, sin constricciones entre la cabeza y el tronco; hocico redondeado en perfil dorsal y lateral; ojos relativamente grandes, colocados dorsolateralmente; con un diámetro ocular de 0,8 mm $\pm 0,1$, la distancia interocular es de 1,5 mm $\pm 0,2$ y el extraocular 3,2 mm $\pm 0,4$. Fosas nasales subcirculares, dorsales. Espiráculo lateral, con abertura redondeada en el costado izquierdo del cuerpo. La longitud de la cola es de 12,7 mm $\pm 1,5$. Las aletas dorsal y ventral se encuentran bien desarrolladas, la primera no extendida sobre la superficie dorsal del cuerpo, ambas son regulares y uniformemente curvadas, con extremo redondeado; la altura máxima de la cola se halla aproximadamente en la longitud media de la misma; el eje de la cola es recto y su extremo termina en punta. La musculatura caudal en la base de la cola tiene una longitud de 1,2 mm $\pm 0,2$.

Disco oral sub-terminal, no visible dorsalmente; ancho del disco oral 1,6 mm $\pm 0,2$; el disco posee una hilera irregular de papilas marginales en la región; claro mental presente, amplio; claro rostral grande; el pico corneo está bien queratinizado siendo de color negro, la porción superior del pico o suprarrostródonte tiene forma de arco mientras que la porción inferior (infrarrostródonte) posee forma de U. Los queratodontes se disponen según la siguiente fórmula dentaria: 2 (2) / 3.

En vida, el dorso y los lados laterales del cuerpo son negros con zonas doradas y marrones. La región ventral es gris, la zona peribranchial es más pálida que la región abdominal; Las aletas son pigmentadas, transparentes y salpicadas de pocas filas irregulares de melanóforos. La musculatura caudal es más oscura, con melanóforos dispuestos más densamente que en las aletas.

Las larvas de *B. pulchella* son tipo IV, exotróficas, lénticas y bentónicas. Presentan un tamaño mediano, con una longitud total de 19,6 mm $\pm 2,6$ y longitud del cuerpo de 8,0 mm $\pm 0,9$; presenta el cuerpo oval, con ancho (5,3mm $\pm 0,8$), sin constricción entre cabeza y tronco; hocico es redondeado en perfil dorsal y lateral; ojos en posición dorsolateral, diámetro ocular de 1,3 mm $\pm 0,4$, distancia interocular de 2,6 mm $\pm 0,6$ y extraocular de 3,8 $\pm 0,5$. Fosas nasales circulares, dorsales. Espiráculo con abertura redondeada en el lado izquierdo del cuerpo. La longitud de la cola es 11,05 mm $\pm 0,5$, aletas dorsal y ventral bien desarrolladas, con márgenes ligeramente curvados; altura máxima de la cola aproximadamente en la región media de la misma. Eje caudal recto y terminado en punta. La altura de la musculatura caudal en la base de la cola es de 1,7 mm $\pm 0,3$; miotomos claramente visibles.

Disco oral sub-terminal, no visible dorsalmente; ancho del disco oral 1,6 mm $\pm 0,2$; Las papilas marginales anteriores y posteriores se disponen en una hilera, claro mental ausente,

rostral presente, papilas submarginales ausentes; el pico corneo está bien queratinizado siendo de color negro, el suprarrostródonte tiene forma de arco mientras que el infrarrostródonte posee forma de pico corneo está bien queratinizado siendo de color negro, la porción superior del pico o suprarrostródonte tiene forma de arco mientras que la porción inferior (infrarrostródonte) posee forma de V. Los queratodontes se disponen según la fórmula 2 (2) / 3 (1).

En vida poseen tonalidades marrones en dorso y lados del cuerpo, más oscuros dorsalmente que lateralmente; región ventral gris plateada, zona peri branquial más pálida que la región abdominal, el cuerpo presenta gran cantidad de guanóforos que producen puntos dorados; aletas escasamente pigmentadas, transparentes y salpicadas de melanóforos; musculatura caudal más oscura con melanóforos dispuestos en manchones más densamente que en las aletas. En el ojo se observa una cruz dorada.

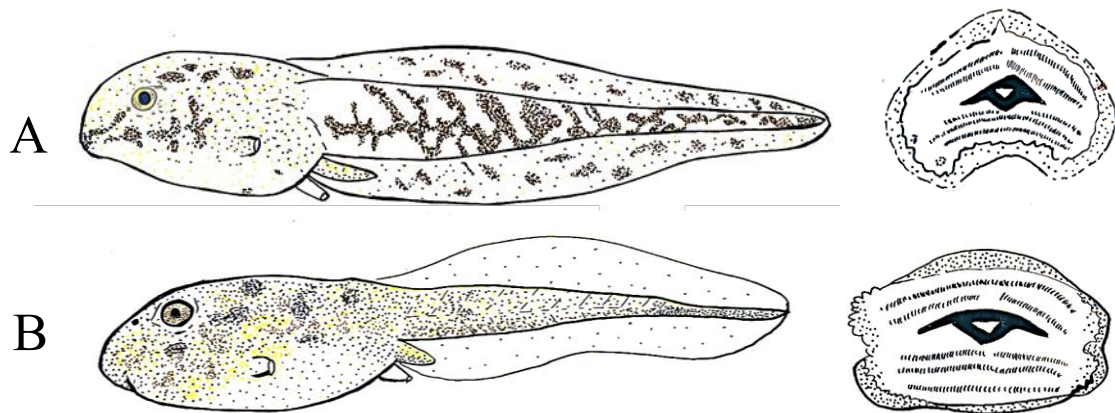


Figura 2.6. Morfología externa y aparato bucal- A- *Boana pulchella*. B- *Rhinella arenarum*..

Tabla 2.1- Medidas de larvas de *Rhinella arenarum* y *Boana pulchella* en estadio 30-32 Gosner.

	<i>Rhinella arenarum</i>				<i>Boana pulchella</i>			
	media	mínima	máxima	Dev.Std	media	mínima	máxima	Dev.Std
Lt	19,62	15,43	24,01	2,67	22,08	19,52	26,16	2,20
Lcu	8,01	6,78	9,48	0,94	8,75	7,61	10,45	1,02
Ancho	5,32	3,93	6,59	0,82	4,47	3,72	5,99	0,69
Diam. ojo	1,29	0,80	1,97	0,41	0,78	0,51	1,10	0,17
Intraocular	2,26	0,63	2,81	0,63	1,49	1,12	1,74	0,19
Extraocular	3,86	3,10	4,55	0,52	3,16	2,42	3,93	0,41
Lco	11,06	7,54	14,42	2,58	12,70	9,45	14,44	1,54
Musc. cola	1,57	1,26	2,00	0,27	1,19	0,83	1,55	0,19
disco oral	1,71	1,16	2,15	0,31	1,57	1,16	1,90	0,24

*Todas las medidas fueron tomadas en mm, en un total de 10 individuos de cada especie. Lt: longitud de cuerpo; Lcu: longitud del cuerpo; Diam. Ojo: diámetro del ojo; interocular: distancia interocular; Extraocular: Distancia extraocular; Lco: Longitud de la cola; Musc. Cola: musculatura de la cola.

2.3.2 Análisis de larvas anormales

Análisis de muestras de larvas de bioensayos

El análisis realizado permitió identificar 20 tipos de anomalías claramente distinguibles (Figura 2.7). Del total de individuos analizados (N: 1393) se detectaron 2.858 anomalías (considerando que un individuo puede presentar más de un tipo de anomalía). Las frecuencias relativas porcentuales de las anomalías más frecuentes fueron: las flexiones (20,29%) y curvaturas (13,82%) de cola, la falta de queratodontes (10,85%), el pico corneo hiperpigmentado (10,99%) y la despigmentación de los queratodontes (7,56%). En la Tabla 2.2 se muestran las distribuciones de frecuencias relativas porcentuales de cada anomalía para el total de los bioensayos.

Tabla 2.2- Tabla de frecuencias de anomalías registradas en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a contaminantes ambientales. *

Anormalidades		fi	ni	ni%
Cola	Flexión	580	0,20	20,29
	Curva	395	0,14	13,82
	Pliegue	100	0,03	3,49
	Quiebre	103	0,04	3,60
	Edema	117	0,04	4,09
	Frágil	146	0,05	5,11
Cuerpo	Hinchado	45	0,02	1,57
	Plano ventral	48	0,02	1,68
	Cóncavo ventral	197	0,07	6,89
	Asimétrico	29	0,01	1,01
	Despigmentado	96	0,03	3,36
	Intestino	27	0,01	0,94
	Edema	18	0,01	0,63
Queratodontes	Ausentes	310	0,11	10,85
	Despigmentados	216	0,08	7,56
	Posición	57	0,02	1,99
Pico corneo	Ausente	43	0,02	1,50
	Despigmentado	17	0,01	0,59
	Hiperpigmentado	314	0,11	10,99
Total		2858		

*fi: frecuencias absolutas, ni frecuencias relativas, ni% frecuencias relativas porcentuales.

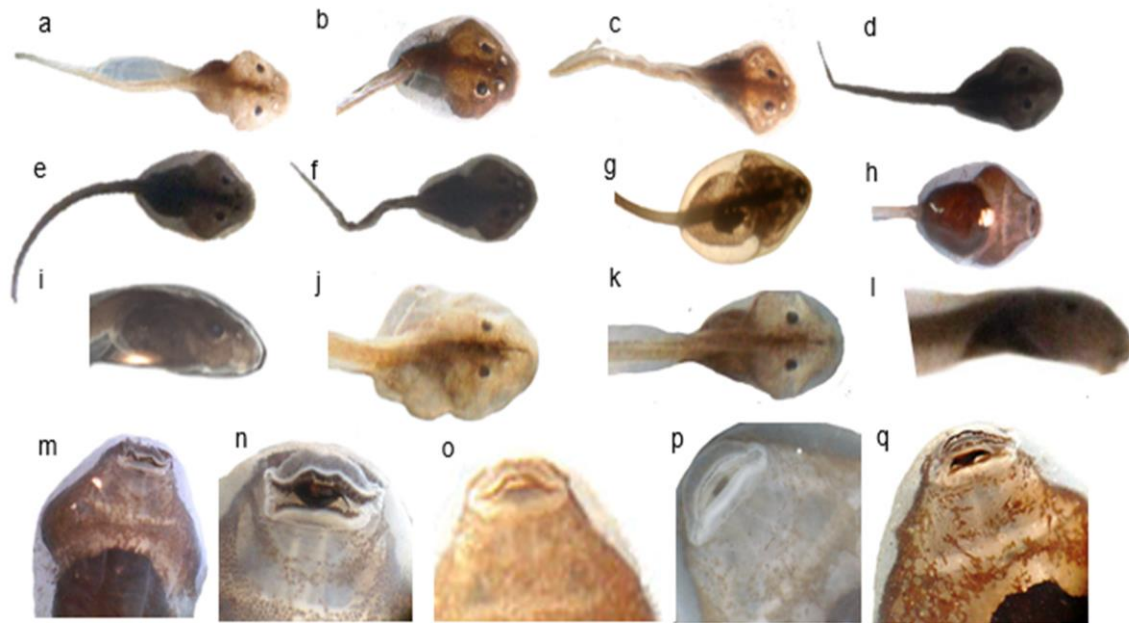


Figura 2.7 Anormalidades registradas en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a contaminantes ambientales. (a- f) Anormalidades en la cola: a- edema, b- Flexión, c-Frágil, d- quiebre, e- curvatura, f- pliegue. (g-l) Anormalidades en el cuerpo: g- intestino reducido y cuerpo hinchado, h- asimetría, i- plano ventral, j- edemas, k-despigmentado, l- cóncavo ventral. (m-q) Anormalidades del aparato bucal m- disposición anormal de queratodontes, n- Pico Córneo hiperpigmentado, o- Despigmentación de pico córneo y queratodontes, p ausencia de pico córneo, q- ausencia de queratodontes.

Considerando el agrupamiento de las anormalidades en las seis categorías descritas en la metodología, la presencia de individuos con anormalidades en la cola resulto significativa para la exposición a Glifosato en las siguientes concentraciones 100mg/l ($p=0,003$), 200 mg/l ($p= 0,006$), 300 mg/l ($p=0,01$) y para la exposición a Cobre a 1mg/l ($p=0,01$) y 1,5 mg/l ($p=0,01$). La presencia de individuos con cuerpo hinchado fue significativa para la exposición a Clorpirifós a una concentración de 0,5 mg/l ($p=0,049$). La presencia de individuos con cuerpos despigmentados fue significativa en individuos expuestos a 0,1 mg Clorpirifos /l ($p=0,02$), 5 mg/l ($p=0,02$) y para el Glifosato a una concentración de 500 mg/l ($p=0,00$). En cuanto a la presencia de individuos con intestinos anormales, estos fueron significativos en individuos expuestos concentraciones de 0,04 y 0,05 mg mercurio/l ($p= 0,03$ y 0,04) respectivamente La presencia de individuos con edemas fue significativamente mayor en individuos expuestos a concentraciones de 0,25 y 0,5 mg de Clorpirifos/l ($p<0,001$) y para el Cadmio en las concentraciones 1mg/l (0,05) y 1,5 mg/l (0,03). Por último, la presencia de individuos con anormalidades en el disco oral fue significativa para concentración de 0,5 mg de Clorpirifos/l ($p<0,001$) y en individuos expuestos a una concentración de 6 mg Cr/l ($p=0.006$).

Mediante la prueba de bondad de ajuste se corroboró la dependencia entre clasificaciones (10 contaminantes ($n=10$) y anormalidades ($n=20$)). Y además se rechazó con $p<0,001$ las

hipótesis de distribución uniforme y de distribución aleatoria de las frecuencias de anomalías.

El análisis multivariado PCA (Figura 2.8 A) permitió distinguir algunas de las anomalías más frecuentes (flexiones y curvaturas de colas, ausencia de queratodontes y pico corneo hiperpigmentado) y asociarlas con algunos de los factores de estrés. Además, como se observa en la Figura 2.8 B, los plaguicidas quedan agrupados en el cuadrante superior derecho y alejados de los metales.

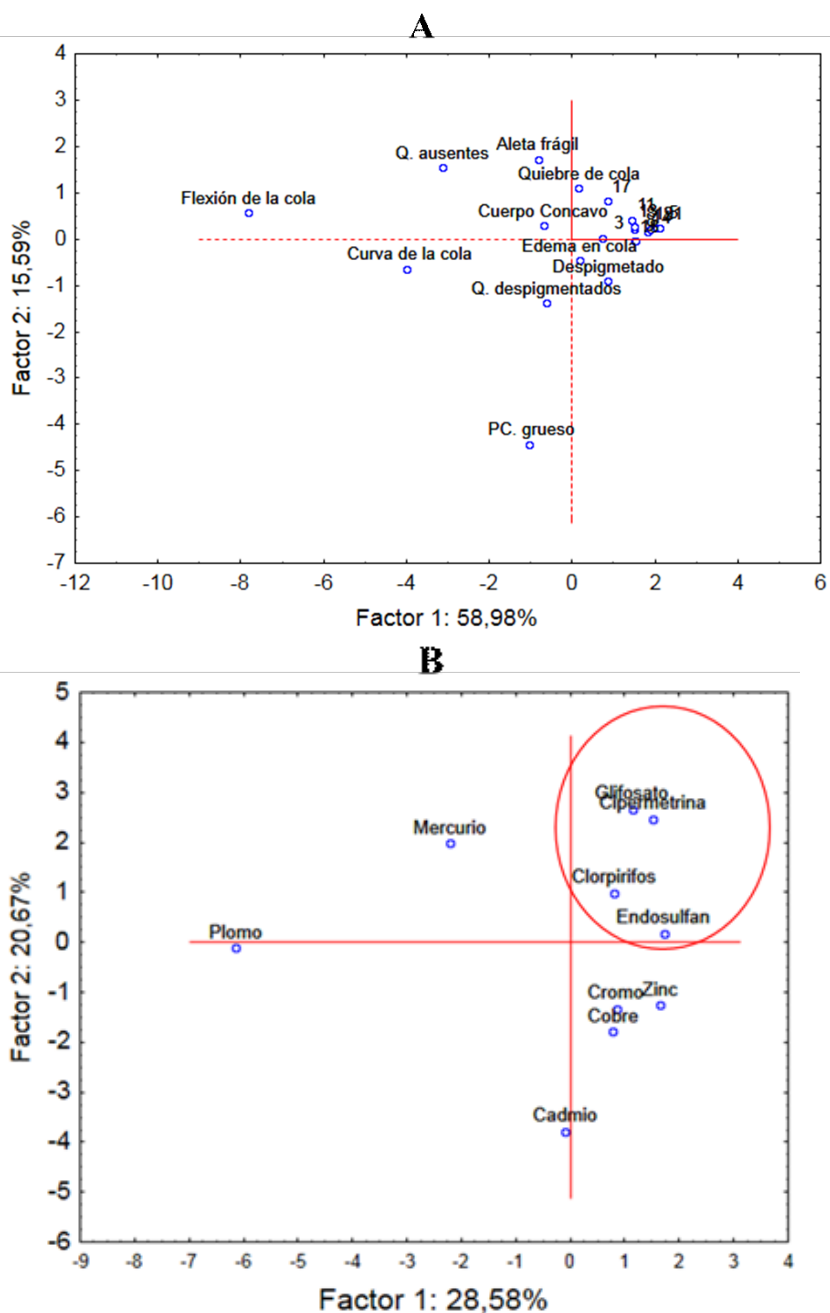


Figura 2.8. Análisis de componentes principales. A- Dispersión de las anomalías en función de los contaminantes. B- Dispersión de los contaminantes en función de las anomalías

Análisis bibliográfico

Los resultados de la búsqueda bibliográfica permitieron encontrar 84 trabajos en el ámbito de la Ecotoxicología que informan sobre la presencia de anormalidades en larvas de anuros ya sea en estudios de campo, como en laboratorio. En el Anexo II se presenta una tabla detallada con las referencias completas de esos trabajos. El análisis de la información contenida en estos trabajos indica que el 90% de los mismos se realizó en laboratorio y el 10% restante a campo. Si consideremos las contaminantes evaluados, el 62% evalúa efectos de pesticidas, 20% efectos de metales pesados y el 18 % otras sustancias. En cuanto a las anormalidades reportadas por estos trabajos, las alteraciones axiales y de la cola (incluidas flexiones, curvaturas, ondulaciones, etc.) son las más frecuentemente reportadas (24%), seguidas por la presencia de edemas (16.6%) tanto de cuerpo como en la cola, alteraciones del disco oral y alteraciones intestinales (representando el 8% cada una), alteraciones en la cabeza (macro y microcefalia), en los ojos y en la pigmentación (6 % cada una). El 20% restante se distribuye entre otros tipos de anormalidades, incluidas la forma del cuerpo y concernientes a diferentes órganos etc.

A pesar de que en los trabajos ecotoxicológicos la presencia de anormalidades suele ser indicada y tenida en cuenta para evaluar y determinar la toxicidad de contaminantes, en la mayor parte de los trabajos solo se hace referencia al tipo de anormalidad sin ninguna descripción anatómica o morfológica que la acompañe, ni con soporte gráfico (foto o dibujo) que permita analizar, corroborar y reconocer dichas anormalidades (tampoco se hace referencia a material de referencia ingresado en colecciones oficiales o formales). Esto constituye un problema a la hora de procesar la información, y confirmar o corroborar los efectos citados, lo que se agrava por la falta de una nomenclatura común, consensuada y precisa útil para definir los tipos de anormalidades, lo que dificulta la comparación de casos y la realización de conclusiones. En fin, resaltando la necesidad de una revisión completa y detallada sobre el tema, acompañada de un análisis comparativo que permita una puesta en común respetando lo propuesto oportunamente por diferentes autores en las descripciones originales de las anormalidades a continuación, se presenta una propuesta de nomenclatura unificada acompañada de una descripción de las anormalidades, ponderando su importancia y relevancia al momento de evaluar los efectos de los contaminantes ambientales sobre larvas.

Lista de anormalidades

Alteraciones axiales

Flexión de la cola (Figura 2.7 b): Es una pronunciada flexión que se genera desde la base de la cola desplazando la misma respecto al plano sagital de su eje, tanto hacia los laterales como en sentido dorsal-ventral. Considerando que las larvas que presentan este tipo de anormalidad pueden presentar alteraciones en la natación, lo cual conllevaría a un problema en la obtención de alimento y huida de los de depredadores, pero, que no genera directamente la muerte de los individuos se la consideró de gravedad leve a media dependiendo del grado de

curvatura de la cola y la movilidad de los individuos. A pesar de que esta anomalía fue descrita por Bantle (1996) como: “severe lateral flexure of the tail and dorsal flexure of the tail” pocos autores siguen esta terminología (Agostini *et al.*, 2010; Allran & Karasov, 2000; Nadia Carla Bach *et al.*, 2016; Borges *et al.*, 2019; Svartz, Herkovits, & Pérez-Coll, 2012; G. V. Svartz *et al.*, 2016). En la bibliografía consulta los trabajos más antiguos que nombran esta anomalía son los de Cooke (Cooke, 1972, 1981) quienes la denominan “lateral deflection at base of tail” y “severe lateral kink at base of tail”. Nosotros proponemos utilizar la denominación de Bantle (Flexión lateral o dorsal). Al consultar la bibliografía y mediante la observación de las fotos presentadas y las descripciones esta anomalía fue también denominada por otros autores con los siguientes nombres: Escoliosis, alteración o malformación en el eje axial, curvatura e incurvación (Brunelli *et al.*, 2009; Chen, Gross, & Karasov, 2006; Devi & Gupta, 2013).

Curvatura de la cola (Figura 2.7 e): A diferencia de la flexión, la curvatura es una desviación curva de la cola que se genera en dirección lateral o dorso-ventral de manera más pronunciada en la región central de la cola. Considerando que las larvas que presentan este tipo de anomalía no presentan mayores problemas para la natación, ni la alimentación y que no genera directamente la muerte de los individuos se la consideró de gravedad leve. El trabajo más antiguo encontrado que nombra esta anomalía y presenta dibujos de la misma es el de Cook *et al.* (1970 y 1981), quienes la denominan “Upcurved”, “downcurved”, “lateral curve in tail”, Nosotros proponemos utilizar esta denominación. Al consultar la bibliografía y mediante la observación de las fotos presentadas y las descripciones esta anomalía fue también denominada por otros autores con los siguientes nombres: cola doblada, flexión, desviación (Lenkowski, Reed, Deininger, & McLaughlin, 2008; Park, Kang, & Gye, 2010; Park, Song, Kim, & Gye, 2017).

Pliegue de la cola (Figura 2.7 f): Se da cuando la cola se dobla o pliega lateralmente, formando un ángulo. Esta anomalía se clasificó con grado de severidad media ya que, si bien no provoca la muerte directa de los individuos, estos pueden presentar alteraciones en la natación que consecuentemente pueden ocasionar problemas en la búsqueda de alimento. Esta anomalía fue descrita por Cook (1970) como: “Lateral kink at base of tail”. En la bibliografía consultada, esta anomalía fue denominada por otros autores como: curvatura, ondulación y “Twist” (Carolina M Aronzon, Sandoval, Herkovits, & Pérez-Coll, 2011; Hopkins, Congdon, & Ray, 2000; Liendro, Ferrari, Mardirosian, Lascano, & Venturino, 2015).

Quiebre de la cola: Es la ruptura o lesión de musculatura caudal que puede darse tanto en la base como en región media de la cola, pero más comúnmente en el extremo. Esta anomalía se clasificó con grado de severidad leve ya que, si bien no provoca la muerte directa de los individuos, estos pueden presentar leves alteraciones en la natación que consecuentemente pueden ocasionar problemas en la búsqueda de alimento. No se encontró bibliografía al respecto de esta anomalía.

Cuerpo plano o cóncavo ventralmente (Figura 2.7 i, l): La parte ventral de los individuos que por lo general es levemente convexa presenta en el primer caso, una forma totalmente plana, en el segundo de los casos se observa una concavidad ventral evidente acompañada de una curvatura de la notocorda a nivel del cuerpo. Estas anomalías se clasificaron con grado de severidad leve ya que, si bien no provocan la muerte directa de los individuos, estos podrían presentar alteraciones en la asimilación del alimento ya que el intestino se encuentra comprimido. En la bibliografía consultada no se encontraron trabajos que reporten este tipo de anomalía.

Cuerpo asimétrico (Figura 2.7g): Desarrollo mayor o menor de alguna región del cuerpo que causa asimetría y la pérdida de bilateralidad en el individuo afectado. Esta anomalía fue clasificada con grado de severidad grave ya que esta asimetría podría causar daños en órganos importantes provocando la muerte de los individuos, además de ocasionar posibles problemas en la natación. Esta anomalía fue reportada por (Rosenshield, Jofré, & Karasov, 1999), aunque no presenta fotos ni descripción.

Intestino reducido (Figura 2.7 h): Intestino que presenta una longitud menor a la normal con la consecuente disminución de la cantidad de asas enrolladas. Esta anomalía fue clasificada con grado de severidad grave ya que esta anomalía podría devenir en la muerte de los individuos y además podría ocasionar problemas en la asimilación de la alimentación. Bantle (1996) nombra engloba a las anomalías ocurridas en el intestino como: “gut abnormalities” y aunque no define esta anomalía con un nombre particular, presenta fotografías que muestran este tipo de alteración. En la bibliografía consultada varios autores reportan esta anomalía (Agostini *et al.*, 2010; Carolina Mariel Aronzon, Marino, Ronco, & Pérez Coll, 2014; Lenkowski *et al.*, 2008; Lenkowski, Sanchez-Bravo, & McLaughlin, 2010; Moriyama *et al.*, 2011; Guillermo Sebastian Natale *et al.*, 2018).

Hipo o Hiperpigmentación (Figura 2.7 k): Se trata de una alteración en el patrón normal de pigmentación que se puede manifestar tanto por exceso (hiper) o por carencia o disminución (hipo) en cualquier área de la superficie de la larva (cuerpo, cola o piezas bucales). Considerando que las larvas que presentan este tipo de anomalía pueden presentar problemas a la hora de esconderse de depredadores, pero, que no genera directamente la muerte de los individuos ni problemas en la natación o alimentación se la consideró de gravedad leve. En la bibliografía consultada varios autores reportan esta anomalía (Abbasi & Soni, 1984; Aguillón-Gutiérrez & Ramírez-Bautista, 2015; Brunelli *et al.*, 2009; Calevro, Campani, Raghianti, Bucci, & Mancino, 1998; Cooke, 1972; Luo, Plowman, Hopfer, & Sunderman, 1993; Moriyama *et al.*, 2011; Plowman, Grbac-Ivankovic, Martin, Hopfer, & Sunderman Jr, 1994; Sansiñena *et al.*, 2018; Severtsova, Aguillon-Gutierrez, & Severtsov, 2012; G. Svartz, Aronzon, & Coll, 2016)

Edemas (Figura 2.7 a-j): Es la presencia de exceso de líquido en intersticios tisulares, a nivel extracelular o incluso intracavitario causando una hinchazón blanda tanto generalizada (en todo el cuerpo) como localizada, sea en regiones específicas del cuerpo o en la cola. Esta

anormalidad fue clasificada con grado de severidad muy grave ya que podría devenir en la muerte de los individuos y además podría ocasionar problemas en la natación de los individuos. Esta anormalidad es una de las más reportadas en la literatura eco toxicológica. Bantle (1996) las define como edema haciendo una distinción entre estas y las ampollas (edemas de menor tamaño). En la bibliografía consultada varios autores reportan esta anormalidad (Allran & Karasov, 2000; Carolina Mariel Aronzon, Marino, Ronco, & Pérez Coll, 2014; Carolina M Aronzon *et al.*, 2011; Nadia C Bach, Marino, Natale, & Somoza, 2018; Calevro *et al.*, 1998; Haywood, Alexander, Byrne, & Cukrowska, 2004; Krishnamurthy & Smith, 2011; Lajmanovich, Sandoval, & Peltzer, 2003; Lenkowski *et al.*, 2008; Lenkowski *et al.*, 2010; Liendro *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 1993; Moriyama *et al.*, 2011; Mussi & Calcaterra, 2010; Park *et al.*, 2010; Quintero & De Dulce, 1996; Sotomayor, Lascano, de D'Angelo, & Venturino, 2012).

Hinchazón corporal: Se manifiesta como un cuerpo hipergloboso, inflado a causa de la acumulación de aire tanto en toda la cavidad del cuerpo (aspecto de globo) o en áreas del cuerpo más restringidas. Esta anormalidad fue clasificada con grado de severidad muy grave ya que podría devenir en la muerte de los individuos y además ocasiona problemas en la natación y en la búsqueda de alimento. Debido a que en la literatura ecotoxicologica no se hace una clara distinción entre edema e hinchazón solo se identificaron tres trabajos que por las fotografías y descripción corresponden con este tipo de anormalidad (Lajmanovich, Peltzer, Attademo, Cabagna-Zenklusen, & Junges, 2012; Guillermo Sebastian Natale *et al.*, 2018; Sansiñena *et al.*, 2018).

Ausencia de Queratodontes (Figura 2.7 q): Es la pérdida o falta de queratodontes que puede manifestarse tanto en una fila entera o en varios queratodontes de una o más filas en particular. Considerando que esta anormalidad puede traer problemas en la alimentación de los individuos a tal punto que se vea disminuido su performance se la considero de gravedad media. Esta es una de las anormalidades más comúnmente reportada. En la bibliografía consultada el trabajo más antiguo que reporta esta anormalidad es el de (Rowe, Kinney, & Congdon, 1998), otros autores también la han denominado como falta o pérdida de queratodontes o formula de fila de dientes anormal (Babini, Salas, de Lourdes Bionda, & Martino, 2015; Medina, Ponssa, Guerra, & Aráoz, 2013; Guillermo Sebastian Natale *et al.*, 2018).

Disposición anormal de Queratodontes (Figura 2.7 h): Se manifiesta en filas de queratodontes que se disponen anormalmente, de forma ondulada o de manera diferente al patrón específico descrito para la especie (formula dentaria). Considerando que esta anormalidad puede traer problemas en la alimentación de los individuos, pero estos pueden aun alimentarse se la considero de gravedad leve. El trabajo más antiguo, según la bibliografía consultada, que reporta esta anormalidad es el de Rowe *et al.*, (1996) pero en este caso denomina a esta anormalidad como anormalidades orales. Otros autores que han

reportado este tipo de anomalía fueron: (Babini *et al.*, 2015; Drake, Altig, Grace, & Walls, 2007; Kadekaru, Tamukai, Tominaga, Goka, & Une, 2015; Medina *et al.*, 2013).

Ausencia de Pico córneo (Figura 2.7 p): Se manifiesta como la pérdida o falta del pico córneo. Esta anomalía puede ser causada por un daño mecánico por la ingesta de partículas, por la acción de contaminantes o patógenos, pero no se han estudiado los mecanismos que causan esta deformidad. Esta anomalía se clasificó con grado de severidad grave ya que la alimentación de los individuos puede verse alterada a tal punto de reducir su performance. En la bibliografía consultada esta anomalía fue reportada por Fellers *et al.*, (2001); Marantelli *et al.*, (2004) y Bach *et al.* ((Nadia Carla Bach *et al.*, 2016)

2.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos del campo y del mantenimiento en laboratorio de las especies de estudio permiten afirmar que ambas especies poseen ciertos atributos que son favorables para ser utilizadas como modelos de estudio. Algunas de estas características son su amplia distribución y abundancia en los ecosistemas, sumada al gran número de huevos que depositan (Guillermo Sebastián Natale, 2006); la facilidad de detección en el campo, tanto de las puestas como de las larvas y adultos; el estado de conservación de ambas especies el cual es no amenazadas (Kehr, 1989; Kehr, 1987; Ziegler, Berazategui, & Arim, 2014); el mantenimiento y cría en laboratorio tanto de la fase larval como la adulta es sencilla y no presenta dificultades. En particular *B. pulchella* se reproduce en dos momentos del año por lo tanto las larvas de esta especie están presentes durante gran parte del año en diferentes estadios de vida. A partir de los datos aportados por la presente tesis doctoral y tomando en consideración estudios previos, consideramos que tanto ***B. pulchella* como *R. arenarum* son buenos modelos de estudio y pueden ser utilizados en estudios ecotoxicológicos.**

A partir de los resultados obtenidos producto del mantenimiento de las larvas en laboratorio y su posterior descripción morfológica podemos decir que los porcentajes de supervivencia presentado por las larvas de ambas especies fueron altos comparados con los registrados por otros autores para las mismas especies. Kehr (1989) informa una mortalidad para *B pulchella* de 21, 8%, en larvas mantenidas en condiciones similares a las planteadas en esta tesis mientras que Natale (2006) reportó supervivencias del 100% para larvas controles de un ensayo crónico. En cuanto a larvas de *R. arenarum* Miranda y Pisano (1993) reportaron una supervivencia entre el 70 y el 80%.

El tiempo total requerido para alcanzar la metamorfosis para *B pulchella* fue similar a la reportada por otros autores, por ejemplo, Kehr (1989) y Natale (2006) informan un tiempo total de metamorfosis de 108 días y 127 para esta especie. Por otro lado *R. arenarum* presento un tiempo total a la metamorfosis mayor que la reportada por de Martín (1985) los cuales informan un tiempo de 33 días. Esta diferencia podría atribuirse a las condiciones de

laboratorio, temperatura, fotoperiodo, volumen de agua, densidades de larvas empleadas o la cantidad de alimento suministradas.

Las tasas de crecimiento y desarrollo para ambas especies se mantuvieron constantes. En las tasas de crecimiento no se observó una disminución de tamaño ni peso durante el climax como los observados por Martin (1985) para *R. arenarum*.

La descripción morfológica de ambas especies coincide con las descriptas por otros autores (Echeverría, 1992; Fabrizi & Vera, 1997; Kolenc *et al.*, 2008). En particular para *Boana pulchella* las longitudes reportadas en el Kolenc *et al.*, 2008 son mayores que las halladas en esta tesis, por lo que cabe aclarar que las larvas utilizadas en el citado trabajo presentan estados de desarrollo más avanzados (31-35 EG), y fueron colectadas en Montevideo en el mes de Agosto por lo tanto son larvas esta diferencia pueden atribuirse a diferencias entre poblaciones.

La fórmula dentaria registrada en esta tesis para *B. pulchella* coincide con la descripta como “formula a” por Echeverría, (1992) y por la descripta por Kolenc *et al.*, (2008) (2 (2) / 3 (1).), no así la formula b de Echeverría (1992) la cual presenta en la región inferior una fila menos de queratodontes. Mientras que la formula dentaria de *R. arenarum* coincide con la descripta por Fabrizi & Vera (1997) (2 (2) / 3)

Teniendo en cuenta los datos y discusiones presentados podemos concluir que, **las larvas de *Boana pulchella* y *Rhinella arenarum*, criadas desde huevos (obtenidos de los sitios de referencia) en las condiciones establecidas de laboratorio presentan una morfología, tasas de desarrollo, crecimiento y supervivencia acordes a las descriptas para estas especies. Pudiendo emplear o considerar los parámetros estimados como valores de referencia normales.**

En tal sentido, los resultados obtenidos contribuyen con información de base sobre aspectos fisiológicos y morfológicos de larvas de ambas especies de estudio. La evaluación de las características típicas larvales permitió establecer parámetros normales y material de referencia que fue útil a la hora de determinar anormalidades en larvas tanto expuestas como de campo (ver capítulos posteriores).

Tal como se mencionó en la introducción, las alteraciones ocurridas por la acción de estresores naturales o artificiales en las larvas de anfibios pueden causar patologías generando anormalidades morfológicas (Sparling *et al.*, 2010).

Al evaluar la presencia y frecuencia de anormalidades en larvas de *R. arenarum* provocadas por contaminantes, se observó un gran número de larvas con anormalidades.

Las anormalidades más frecuentes fueron: Las flexiones y curvaturas de la cola, estas anormalidades se presentaron en frecuencias significativamente elevadas en las larvas

expuestas a Glifosato y Cobre. Esta anomalía había sido reportada en varias publicaciones y para varios contaminantes, como metales pesados (Pérez- Coll *et al.*, 1988, Haywood *et al.*, 2004) y pesticidas (Brunelli *et al.*, 2009, Agostini *et al.*, 2010, Svartz *et al.*, 2016b, Svartz *et al.*, 2016a). La presencia de anomalías en la cola de las larvas puede causar dificultades en la movilidad de los individuos, convirtiéndose en presas fáciles, además pueden ocasionales problemas para alimentarse, por lo tanto, estas anomalías fueron clasificadas con grado de severidad de leve a moderado.

Anomalías en el disco oral, las cuales presentaron frecuencias de ocurrencias significativamente altas en las larvas expuestas a Clorpirifos y Cromo. Dentro de estas alteraciones podemos mencionar la Ausencia de queratodotes, este tipo de anomalía también fue reportada por otro autor para la exposición de metales y pesticidas (Rowe *et al.*, 1998, Medina *et al.*, 2013, Babini *et al.*, 2015, Bach *et al.*, 2016). La ausencia de queratodotes podría estar influenciada por otros factores tales como los alimentos ingeridos y la fricción al roer elementos duros, además, la incidencia de deformidades orales también fue asociación con infección por hongos (Drake *et al.*, 2007). La presencia de pico corneo hiperpigmentados fue registrada en este trabajo. Estas piezas presentaban una mayor queratinización. Al consultar la literatura no se encontraron trabajos que identificaran este tipo de anomalía. Por el contrario si hay varios trabajos que hablan de una falta de queratinización en las mandíbulas (Drake, 2007; Tolledo *et al.*, 201; Bosch *et al.*, 2017). Esta anomalía puede ocasionar problemas en la alimentación de las larvas, en los casos que la disposición de los queratodotes se vea muy alterada los renacuajos no se alimentan correctamente y presentan problemas de crecimiento y desarrollo (Venesky *et al.*, 2010). Por lo tanto, esta anomalía fue clasificada con un grado de severidad de moderado a grave.

Otra de las anomalías más frecuente registrada fue la despigmentación del cuerpo, la cual fue significativamente mayor en las larvas expuestas a Clorpirifos y Glifosato, este tipo de anomalía se da por una disminución de la expansión de los melanóforos. Otros autores han reportado este tipo de anomalías (Brunelli *et al.*; 2009, Abbrasi *et al.*; 1984, Calevro *et al.*; 2007), tanto para la exposición a metales como a plaguicidas. La disminución en la expansión de melanóforos podría representar una pérdida en la capacidad de las larvas de permanecer ocultas de los depredadores y también podría hacer que los individuos sean más sensibles a la irradiación ultravioleta por lo tanto esta anomalía se clasificó con grado de severidad leve.

Además de detectar anomalías frecuentes como las nombradas anteriormente se identificaron algunas anomalías que si bien no fueron muy frecuentes resultaron ser significativas para alguno de los contaminantes evaluados, por ejemplo, la presencia de individuos hinchados fue significativamente mayor en las larvas expuestas a Clorpirifós este tipo de anomalía fue reportada por (Lajmanovich *et al.* 2012, Natale *et al.* 2018, Sansiñena *et al.* 2018). Las larvas que presentan este tipo de anomalía es probable que no sobrevivan

y además poseen una movilidad disminuida y flotan en el agua lo cual las hace vulnerables a la predación. Por lo tanto, fueron clasificadas con un grado de severidad muy grave. La presencia de edemas tanto en el cuerpo como en la cola fue significativamente alta en los individuos expuestos a Clorpirifos y Cadmio. Este tipo de anormalidad es uno de los más reportados en la literatura ecotoxicológica (Stebler *et al.*; 1987, Calevro *et al.*; 2005, Mc Daniel *et al.*; 2008, Brunelli *et al.*; 2008, Allran *et al.*; 2000; Stebler *et al.*; 1987, Mathieu-Denoncour *et al.*; 2014). La causa es debida a un desbalance en la osmorregulación de los líquidos corporales, esto puede ser causado por múltiples contaminantes. En cuanto a las consecuencias de esta anormalidad podemos decir que de presentarse de forma generalizada podría causar la muerte de los individuos, además de provocar alteraciones en la natación más aun cuando el edema se presenta en la cola, por lo que fue clasificada con un grado de severidad muy grave. Por último, la presencia de individuos con anormalidades en intestinos fue significativo en las larvas expuestas a Mercurio. Si bien en este trabajo se observó la presencia de individuos con intestinos reducidos en la literatura también se han reportado alteraciones en el enrollamiento del intestino (Stebler *et al.*, 1987; Peltzer *et al.*, 2013; Mathieu-Denoncour *et al.*, 2014). Estos tipos de anormalidad podrían afectar la digestión y la consecuente nutrición de las larvas llevando en algunos casos a la muerte por lo que se clasifico con un grado de severidad grave.

El análisis de la información resultante de la búsqueda bibliográfica permitió comparar los resultados obtenidos y describir las anormalidades halladas. En tal sentido podemos concluir que **los factores de estrés afectan las características morfológicas de las larvas ocasionando anormalidades**. El hecho de no poder identificar un patrón de anormalidades con un factor particular siendo que registramos las mismas anormalidades con varios contaminantes. Nos permite concluir que muchas de ellas son de baja especificidad. Esto se corresponde con lo expuesto por Riley y Vorhees (1986) quienes afirman que diferentes estresores ambientales presentados en la misma etapa del desarrollo pueden ocasionar errores similares en el desarrollo causando la misma consecuencia o anormalidades.

La presencia de anormalidades suele ser indicada y tenida en cuenta para determinar la toxicidad de contaminantes, en la mayor parte de los trabajos ecotoxicológicos solo se hace referencia del tipo de anormalidad sin ninguna descripción anatómica o morfológica que la acompañe, ni con soporte gráfico (foto o dibujo) que permita analizar, corroborar y reconocer dichas anormalidades (tampoco se hace referencia a material de referencia ingresado en colecciones de instituciones). Estos problemas se suman a la falta de una nomenclatura común para las anormalidades, lo que dificulta la comparación de casos y la realización de conclusiones. En ese sentido se propone nomenclatura unificada realizada a partir de una revisión crítica y detallada sobre el tema, acompañada de una puesta en común respetando lo propuesto por diversos autores en las descripciones originales de las anormalidades. Dicha lista será utilizada en la descripción de las anormalidades en los siguientes capítulos.

Los resultados permiten asociar la expresión de anormalidades con la exposición a determinados factores de estrés, esto aporta evidencias para proponer la presencia de anormalidades en larvas de anuro como punto final de evaluación.

CAPÍTULO 3: BIOENSAYOS CON SEDIMENTOS

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 Composición y estructura de los sedimentos

La erosión de la superficie de la tierra provocada por la escorrentía libera partículas sólidas que quedan en suspensión en el agua. Estas partículas incluyen materia orgánica (detritos, ácidos húmicos y fúlvicos, pigmentos y microorganismos) y minerales como por ejemplo minerales arcillosos (caolinita, illita, clorita, etc.), aluminosilicatos (cuarzo, feldespato, mica), carbonatos de calcio (calcita, dolomita) y minerales de hierro (geothita, hematita etc.). Estas partículas varían en tamaño desde grava hasta arena, limo y arcilla (I. Allan & Stegemann, 2007).

Cuando las partículas se transportan a las aguas superficiales pueden permanecer en suspensión, si el flujo es suficientemente alto, o pueden sedimentar en el lecho para formar sedimentos en el fondo del canal. Una vez que llegan al lecho pueden formar una capa estable o ser transportados gradualmente río abajo. Los periodos de estabilidad pueden alternar con periodos de deposición o erosión dependiendo de los cambios en las condiciones del flujo.

El sedimento de fondo se forma en un proceso de decantación en capas sucesivas de material que puede consolidarse a lo largo del tiempo. Esto lleva a que la composición y la porosidad de los sedimentos presenten variaciones en función de la profundidad. Por ejemplo, la concentración de oxígeno varía según la profundidad siendo mayor en la región inmediatamente debajo de la interfaz agua-sedimento limitando a esta región el crecimiento de organismos aerobios. Otro factor que varía según un gradiente de profundidad es el pH debido a la reacción de CO₂, la mineralización de la materia orgánica y la síntesis de ácidos orgánicos por organismos anaerobios. Otro factor, no menos importante, que presenta un gradiente según la profundidad es la luz, la cual es mayor en la interfaz agua-sedimento, contribuyendo, junto con el oxígeno, al desarrollo de organismos aeróbicos en esta región (I. J. Allan, House, Parker, & Carter, 2004). La capa que presenta concentraciones de oxígeno óptimas para la vida alberga una gran variedad de organismos, desde bacterias y algas hasta macroinvertebrados. Estos organismos pueden alterar las propiedades de los sedimentos, por ejemplo, si los microorganismos se agregan y forman una biopelícula (biofilm), reducen la porosidad del sedimento de fondo. Por otro lado, las actividades de excavación y alimentación de organismos más grandes pueden llevar a la mezcla de sedimentos, conocida como bioturbación, o canalizar y mejorar el transporte de solutos mediante bioirrigación (Matisoff & Wang, 1998). Todos estos procesos alteran las propiedades del sedimento e influyen en la captación y retención de contaminantes.

3.1.2 Los sedimentos como destino final de los contaminantes

Los sedimentos derivados de las superficies terrestres pueden incluir, además de los materiales naturales, previamente nombrados, compuestos de origen antropogénico, los cuales pueden considerarse contaminantes (Stangroom, Collins, & Lester, 1998). Un sedimento contaminado se define como aquel material acumulado en el fondo de cuerpos de agua conteniendo sustancias químicas en exceso, en relación con criterios geoquímicos y/o toxicológicos de calidad, o que pueden tener efectos adversos en el ambiente o en la salud humana (G. A. Burton et al., 2002).

Los contaminantes pueden unirse inicialmente a sedimentos suspendidos, que luego se depositan para formar los sedimentos de fondo (Audry, Schäfer, Blanc, Bossy, & Lavaux, 2004; Erickson, Turner, & Thibodeaux, 2005). Estas partículas sedimentadas pueden llegar a ciertas profundidades en las cuales ya no se ven afectadas por la bioturbación ni por procesos superficiales quedando confinados. Este confinamiento las aleja de la posibilidad de ciclar dentro de los ecosistemas e interactuar con los seres vivos, a menos que ocurran procesos de remoción. De esta manera los sedimentos resultan aceptores finales de contaminación (G. A. Burton et al., 2002).

Los procesos que determinan el destino y el comportamiento de los contaminantes en los sedimentos de fondo se resumen en la Figura 3.1.

El reparto de los contaminantes entre las partículas de sedimento y el agua de poro (agua contenida entre las partículas de sedimento) se determina por adsorción o precipitación. La adsorción favorece la inmovilización de los contaminantes por retención en las partículas de sedimento y depende de las características fisicoquímicas del contaminante, de las partículas del sedimento y del agua de poro (Karickhoff, 1984).

La transferencia o reparto de contaminantes a través de la interfaz de agua de sedimento, así como también dentro del sedimento se produce mediante la difusión o advección. La difusión ocurre cuando los contaminantes presentes en el agua sobrenadante difunden al agua de poro, la que inicialmente contiene concentraciones de contaminante relativamente más bajas. También los contaminantes acumulados a lo largo del tiempo en los sedimentos de fondo se liberan en el agua de poro y difunden en el agua suprayacente relativamente no contaminada. El transporte por difusión es significativo para los contaminantes con afinidad por la fase acuosa y en sedimentos altamente porosos (W. Daniels, House, Rae, & Parker, 2000; W. M. Daniels, 1998). La advección corresponde al movimiento de material disuelto o particulado fino a la velocidad de la corriente en cualquiera de las tres direcciones (longitudinal, lateral y vertical) esto contribuye al movimiento de los contaminantes en la columna de agua.

Además de los procesos físicos mencionados, el comportamiento y destino final de los contaminantes está influenciado por procesos químicos y biológicos. La bioturbación está

dada por el movimiento de los contaminantes del sedimento y/o del agua de poro y por la actividad de los integrantes de la comunidad bentónica a través de la alimentación y excavación de organismos bentónicos (Grapentine et al., 2002; Thibodeaux & Bierman, 2003). La movilidad de los contaminantes inorgánicos en los sedimentos de fondo puede cambiar de acuerdo con el ambiente químico proporcionado por el sedimento, así como también los compuestos orgánicos están sujetos a degradación abiótica y biótica. Una revisión de la literatura sobre reacciones y tasas de degradación de varios productos químicos en muchas situaciones acuáticas se pueden consultar en los trabajos de Stangroom *et al.* (2000) y Warren *et al.* (2003). Las variaciones en el contenido de O₂ dependientes de las concentraciones en las especies donadoras oceptoras de electrones (por ejemplo, Fe (III), óxidos de Mn (III) y (IV)) de especies altamente reactivas (por ejemplo, porfirinas de hierro o radicales hidroxilos) y las condiciones de pH, afectarán tanto la transformación como la degradación de los compuestos orgánicos.

Tanto la degradación química como la biológica pueden hacer que las concentraciones de contaminantes disminuyan con el tiempo, y la presencia de biofilm (comunidad perifiton) puede contribuir a esto, así como a la inmovilización de contaminantes y cambios en las propiedades físicas de los sedimentos, como la porosidad o la permeabilidad.

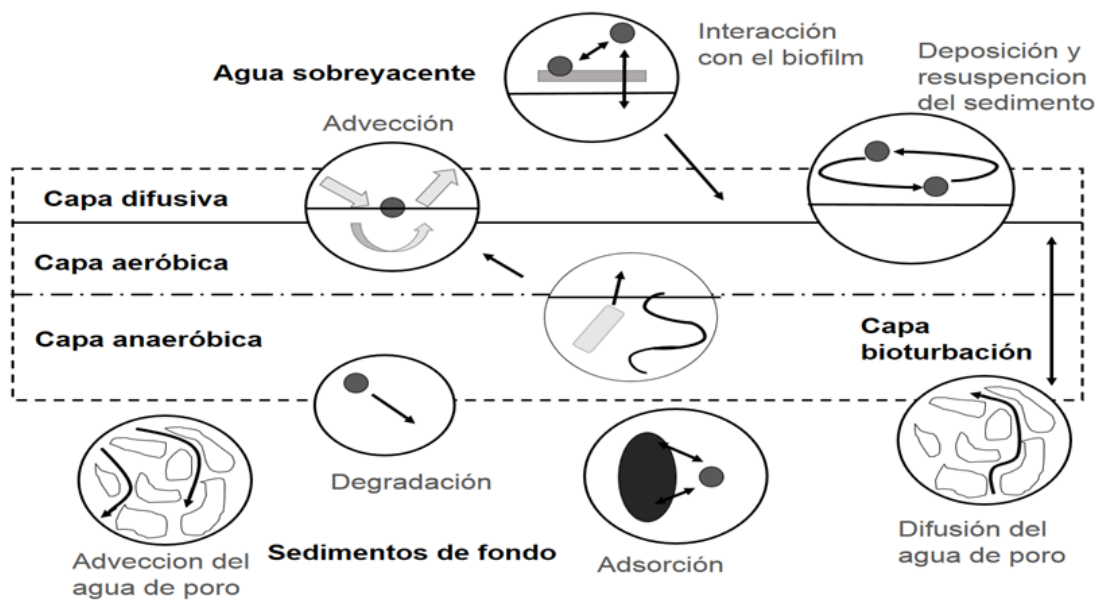


Figura 3.1. Diagrama general de la estructura de los sedimentos y los procesos involucrados en el destino de los contaminantes en los sedimentos de fondo (Tomado de (I. Allan & Stegemann, 2007)).

Tal como se mencionó en la introducción general, el origen, el destino y los efectos de los contaminantes en el ambiente son objeto de estudio de la ecotoxicología empleando, entre otras cosas, los bioensayos de toxicidad estandarizados, como herramientas bioanalíticas y experimentales. Existen gran cantidad de bioensayos específicos para evaluar la toxicidad de compuestos puros, mezclas de compuestos, e incluso muestras provenientes de diferentes compartimentos ambientales como son el agua, el suelo y el sedimento. En la presente tesis utilizaremos como herramienta los bioensayos de toxicidad con sedimentos.

3.1.3 Bioensayos con sedimentos como herramienta bioanalítica

El reconocimiento de que los sedimentos, debido a sus características, actúan como sumidero y fuente de contaminantes ha llevado a un mayor interés en el desarrollo de métodos de prueba estándar para organismos que viven en los sedimentos. Hasta hace relativamente poco tiempo, la mayoría de las pruebas con sedimentos se basaban en estudios de exposición de tipo agudo. En la actualidad se hace hincapié en la importancia de la evaluación mediante pruebas de toxicidad crónica con sedimentos y organismos sensibles (USEPA 2004).

Para evaluar la toxicidad de los sedimentos se suelen utilizar cuatro estrategias, que reflejan diferentes condiciones de exposición a los tóxicos: los bioensayos con agua de poro, (Ingersoll et al., 1995), los bioensayos con elutriados de sedimento (G. A. J. Burton, Denton, Ho, & Ireland, 1995), bioensayos con sedimento completo y la exposición a extractos orgánicos a partir del sedimento, (True & Heyward, 1990). De las cuatro estrategias la que mejor refleja las condiciones naturales a las que están expuestos los organismos en su ambiente es la utilización de sedimento completo. Esta provee una metodología que permite evaluar la biodisponibilidad de los contaminantes para los organismos prueba (Landrum & Robbins, 1990; Riba, Casado-Martínez, Forja, & DelValls, 2004). Por tal motivo fue seleccionada para la realización del presente trabajo.

Estos bioensayos de sedimento se realizan en forma estática o de flujo continuo, dependiendo del organismo y del diseño del ensayo. Los ensayos de sedimento para muestras de campo no se basan en un número determinado de concentraciones de prueba, sino que se basan en una comparación de muestras provenientes de sitios de referencia con sedimentos de sitios de interés provenientes de los ecosistemas que se pretenden evaluar.

A partir de su utilidad e interés, durante las últimas décadas se han desarrollado una gran variedad de protocolos estandarizados por organismos internacionales (Development, 1993; EPA., 2001; EPS, 1997; USEPA, 2000); IRAM, 2003) para evaluar la toxicidad de los productos químicos en los sedimentos utilizando algas, bacterias, moluscos, anélidos, insectos, crustáceos, anfibios y peces (Giesy & Robert, 1989; Ingersoll *et al.*, 1995). En estos métodos se sugieren puntos finales para medir los efectos potenciales de los contaminantes en los sedimentos, incluyendo mortalidad y crecimiento. Sin embargo la mortalidad de los

organismos de prueba es el punto final más comúnmente informado (Benoit, Mason, Gilmour, & Aiken, 2001; Sibley, Ankley, Cotter, & Leonard, 1996)

Los organismos más utilizados para los bioensayos con sedimento son los invertebrados bentónicos (Bettinetti, Giarei, & Provini, 2003; Giusto & Ferrari, 2008; Nebeker et al., 1984). Siendo la especie más utilizada el crustáceo *Hyaella azteca* Saussure (1858) (Brock et al., 2016; Ingersoll et al., 1995; Kubitz, Besser, & Giesy, 1996; Sun, Wang, Li, & You, 2015).

La elección de un organismo prueba adecuado, condiciona el éxito en el desarrollo de la herramienta, su aplicabilidad, la relevancia y el alcance de la información generada, por tal motivo USEPA (2002) propone considerar los siguientes criterios al seleccionar los organismos de prueba a ser incorporados: (1) existencia de una base de datos toxicológica que demuestre sensibilidad a los sedimentos y compuestos de referencia, (2) debe existir información suficiente o base de datos que permita la comparación de procedimientos entre laboratorios, (3) que su modo de vida implique el contacto con el sedimento o la interfaz agua-sedimento, por lo que aconseja utilizar organismos bentónicos, (4) facilidad para encontrarlo y obtenerlo del campo, y fácil mantención en laboratorio, (5) debe ser ecológica o económicamente importante, (6) debe tener una distribución geográfica amplia, de ser posible autóctona del sitio que se está evaluando, o bien tener un nicho ecológico similar a los organismos de interés y (7) debe ser tolerante a una amplia gama de características físico-químicas de los sedimentos (por ejemplo, el tamaño del grano) y ser compatibles con los métodos de exposición, finalmente debe permitir aplicar técnicas vinculadas con los puntos finales de evaluación a medir.

La sensibilidad del organismo va a estar relacionada con la ruta de exposición y la tolerancia individual condicionada en gran parte por la genética y los procesos fisiológicos en general. Los ensayos de sedimentos plantean tres vías de exposición a los contaminantes, que son, el agua de poro, partículas de sedimento y el agua suprayacente. La cantidad de contaminantes que ingresan a los organismos estará determinada por el tipo de alimento, la tasa de alimentación y el comportamiento. Deben considerarse como vías de ingreso, las branquias para ciertos compuestos hidrofóbicos, y la adsorción directa por la pared corporal o por absorción a través del tegumento.

Considerando lo expuesto anteriormente, en la presente tesis se seleccionaron como organismos prueba, larvas de dos especies de anuros autóctonos (*Rhinella arenarum* y *Boana pulchella*), para evaluar los efectos producidos por sedimentos provenientes de sitios con diferentes problemáticas ambientales. Dichas lavas poseen hábitos bentónicos son de fácil identificación y obtención en campo (en relación con su abundancia) y son de fácil mantenimiento en laboratorio, tal como se describió en el Capítulo 2.

Por último, es importante destacar que, a la adecuación de las especies al protocolo de ensayo propuesto, se sumará la incorporación del punto final de evaluación propuesto como eje en

el presente trabajo: “ocurrencia de anomalías morfológicas y análisis de la frecuencia de ocurrencia de anomalías morfológicas” que fueron seleccionadas, clasificadas y descritas en detalle en el capítulo anterior (ver capítulo 2: Lista de anomalías). Tal como se ha venido adelantando, las mismas se proponen como un punto final de evaluación válido para evaluar toxicidad de sedimentos, y su utilización resulta de gran relevancia biológica. Se espera que dicho punto final posea una alta sensibilidad relativa, resultando un buen candidato como biomarcador de efecto, útil tanto en su empleo en bioensayos de toxicidad con sedimentos, así como también para su aplicación en campo.

3.1.4 Bioensayos de sedimento con larvas de anuros

Actualmente hay una cantidad limitada de métodos estandarizados establecidos para evaluar la toxicidad de contaminantes en anfibios. Los mismos fueron resumidos por Johnson et al (2017).

El desarrollo de los bioensayos para anfibios se vio impulsado, en Estados Unidos, con el propósito de prohibir la descarga de contaminantes en cantidades tóxicas. Posteriormente, esto llevó a la creación de las leyes de agua limpia que promovieron el uso de las pruebas de toxicidad de efluentes (WET) (USEPA 1975).

La U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) emitió en 1975 un documento de métodos para realizar pruebas de toxicidad aguda con peces, macroinvertebrados y anfibios (USEPA 1975). Aunque los métodos descritos en el documento de USEPA no son específicos para anfibios, proporcionaron una orientación general para el diseño de bioensayos. Las primeras guías de ASTM para realizar pruebas de toxicidad aguda también fueron generales para invertebrados, peces y anfibios (ASTM E729, 1996; ASTM E1992; 1997; ASTM, 2014; ASTM, 2012a). Varios de estos métodos utilizan como organismos test a la rana de garras africana (*Xenopus laevis* y especies relacionadas como *X. tropicalis*) debido a que poseen varias ventajas. Éstas incluyen la disponibilidad casi constante de múltiples etapas de vida, debido a que poseen un ciclo de vida acuático, y se han desarrollado técnicas de cultivo y reproducción bien establecidas. Los métodos establecidos para *Xenopus* incluyen el Ensayo de Teratogénesis de Embriones de *Xenopus laevis* (FETAX E1439-98: ASTM 2012b) el cual puede utilizarse para evaluar la incidencia de malformaciones además del crecimiento y la mortalidad como efectos de las aguas tratadas en algún proceso y mezclas complejas. Además, se ha utilizado para evaluar extractos de suelos y sedimentos de áreas contaminadas (Birge & Black, 1977; Fort et al., 1999; Fort et al., 2001)

Aunque muchos de los métodos de *Xenopus* están bien establecidos y los resultados han sido validados por distintos grupos de trabajo, esta es una especie exótica, posee un modo de vida estrictamente acuática, con hábitos particulares, es tetraploide, entre otras singularidades, por lo que su empleo para evaluar determinados escenarios fue criticado por Hoke and Ankley (2005). Ellos informaron que los datos de la prueba FETAX eran relativamente insensibles

en comparación con los datos de otros anfibios o de otras especies acuáticas, por lo que su representatividad para el grupo fue cuestionada.

La evaluación de la toxicidad de sedimentos para los anfibios cuenta con una guía ASTM E2591-07 donde se describe un estudio de exposición a sedimentos en 10 días (ASTM, 2007). La especie elegida para esta prueba fue *Lithobates pipiens*, aunque el protocolo especifica que se pueden usar otros anuros norteamericanos, como *Anaxyrus americanus*. Una ventaja de este protocolo es que emplea métodos similares a otras pruebas de toxicidad de sedimentos con invertebrados (USEPA, 2000) y si se combina con estas otras pruebas, puede proporcionar un panorama más completo de los posibles impactos de los sedimentos contaminados en los organismos acuáticos.

En el presente trabajo se toma la información existente y se propone adecuar estos protocolos para emplearlos con larvas de dos especies autóctonas representativas de la anfibiofauna local y que habitan en gran parte de los ecosistemas acuáticos de la región. En ese sentido se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis Generales

1. Los bioensayos de toxicidad con sedimentos empleando larvas de *R. arenarum* y *B. pulchella* resultan una herramienta eficaz para clasificar la toxicidad y peligrosidad de sedimentos asociadas a compuestos tóxicos presentes en los sedimentos de los sitios de estudio.
2. Las larvas expuestas a sedimentos provenientes de sitios contaminados, presentarán una mayor ocurrencia de anomalías, respecto a larvas expuestas a sedimentos de referencia.

Hipótesis específicas

1. Las especies seleccionadas para este estudio resultaran adecuadas para incorporar como especies prueba en protocolos normalizados USEPA/ASTM para la evaluación de toxicidad de sedimentos.
2. Los bioensayos con sedimentos empleando las especies propuestas permitirán obtener resultados confiables y similares a otros bioensayos estandarizados con especies de referencia como lo es el de *H. curvispina*.
3. Los bioensayos con sedimentos aplicando el protocolo propuesto permitirá evaluar la respuesta a nivel individual (efectos letales y subletales) de larvas de *R. arenarum* y *B. pulchella* en diferentes estadios de desarrollo, permitiendo clasificar la toxicidad y peligrosidad de los sedimentos, y realizar inferencias sobre la calidad de los ecosistemas evaluados.

Objetivos generales

1. Evaluar el patrón de respuesta a nivel individual (efectos letales y subletales) de larvas de las especies a estudiar en relación a la exposición a sedimentos provenientes de ecosistemas acuáticos afectados por distintos tipos de actividades antrópicas, mediante bioensayos de toxicidad desarrollados en el presente trabajo de tesis.
2. Determinar si la expresión de anomalías morfológicas, y el análisis de las frecuencias de ocurrencia, resultan buenos puntos finales de evaluación ecotoxicológicos.

Objetivos específicos

1. Adecuar los protocolos normalizados propuestos por USEPA/ASTM (ampliamente aceptados) para ser utilizados con las especies autóctonas seleccionadas.
2. Comparar la respuesta del bioensayo con sedimento empleando larvas de *B. pulchella* respecto de un ensayo estandarizado de referencia como lo es el de *H. curvispina*, al momento de evaluar la toxicidad de sedimentos provenientes de agroecosistemas.
3. Evaluar el patrón de respuesta a nivel individual (efectos letales y subletales) de larvas de *R. arenarum* y *B. pulchella* en diferentes estadios del desarrollo empleando el protocolo propuesto para determinar la toxicidad de los sedimentos.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos de este capítulo se analizaron en detalle los protocolos de bioensayos con sedimentos empleando larvas de anuros de USEPA (1996) - ASTM (2007). Estos protocolos fueron modificados considerando la biología y las condiciones de mantenimiento en laboratorio, óptimas para el buen desarrollo de las especies de estudio. Una vez establecido el protocolo se realizaron bioensayos (Tabla 3.1). Las primeras pruebas se realizaron con larvas en estadio 25 EG y se comparó la respuesta del bioensayo con sedimento empleando larvas de *B. pulchella* respecto de un ensayo estandarizado de referencia como lo es *H. curvispina*. A partir de los resultados de estos primeros bioensayos se ajustaron las condiciones experimentales (con la intención de mejorar su aplicabilidad), y se procedió a realizar bioensayos consecutivos con ambas especies de estudio en diferentes estadios de desarrollo. Realizándose dos ensayos en estadio 8 EG (uno para cada especie), dos ensayos con exposición consecutiva de larvas en estadio 8, 25 y 30 EG (uno para cada especie), un ensayo crónico con larvas de *R. arenarum* y dos ensayos con diluciones de sedimentos utilizando larvas en estadio 25 de *R. arenarum*. Los resultados parciales obtenidos en el transcurso de la investigación, permitieron realizar ajustes al protocolo para mejorar la aplicabilidad de los procedimientos en la práctica de laboratorio.

Tabla 3.1. Ensayos realizados*

Especie	Estadio	Sedimentos
<i>B. pulchella</i>	25	P1(3);P2(4-6);P3(10-13)
<i>B. pulchella</i>	25	P1(3);P2(4-9);P3(10-13);P4(14-19);P5(21)
<i>B. pulchella</i>	25	P1(3);P2(4-8)
<i>R. arenarum</i>	25	P1(1,2);P2(4-9);P3(10,11);P4(14,16); P5(20)
<i>B. pulchella</i>	8	P1(1,3);P2(4-9);P3(10-13);P4(14-18);P5(20)
<i>R. arenarum</i>	8	P1(3);P2(4,5,7,8);P3(11-13);P4(14-16)
<i>B. pulchella</i>	8	P1(1,3);P2(4-9);P3(11-13);P4(14-19);P5(20,21)
<i>B. pulchella</i>	25	P1(1,3);P2(4-9);P3(11-13);P4(14-19);P5(20,21)
<i>B. pulchella</i>	30	P1(1,3);P2(4-9);P3(11-13);P4(14-19);P5(20,21)
<i>R. arenarum</i>	8	P1(3);P2(4-9);P3(11-13);P4(15-19)
<i>R. arenarum</i>	25	P1(3);P2(4-9);P3(11-13);P4(15-19)
<i>R. arenarum</i>	30	P1(3);P2(4-9);P3(11-13);P4(15-19);P5(21)
<i>R. arenarum</i>	8 (crónico)	P1(1,3);P2(5,9);P3(11-12);P4(15,16,18);P5(20,21)
<i>R. arenarum</i>	25	diluciones P5 (21)
<i>R. arenarum</i>	25	diluciones P4 (14)

* Los sitios y las correspondientes problemáticas ambientales donde se tomaron los sedimentos fueron indicados de la siguiente manera problemática: P 1- referencia- 2-agrícola-3 urbana- 4-petroquímica- 5- descargas cloacales. Los sitios mediante números entre paréntesis: 1-Atalaya, 2-Frison, 3-Molfesa, 4-9 Agrícola, 10-Villa Elvira, 11- Zanjón, 12- El Gato, 13- CEAMSE, 14- Canal Este La Plata, 15- Canal Este Berisso, 16-Canal Oeste, 17- Fosforito, 18-Simpson, 19 Arenal, 20- Cloaca La Plata, 21- Cloaca Chascomús.

3.2.1 Colecta de sedimentos

Los sedimentos fueron colectados en los diferentes sitios de estudio (descritos en el Capítulo 1). Siguiendo las recomendaciones del protocolo ASTM 2007. En la tabla 3.1 se indican los sitios donde se colectaron los sedimentos para cada uno de los bioensayos realizados.

En cada sitio de estudio se tomó un total de 3L de sedimento (tomándose múltiples submuestras) realizando la menor perturbación posible del ambiente. Cada una de las muestras compuestas se tomó a una profundidad entre 10 y 30 cm según el cuerpo de agua, recogiendo los primeros 15 cm del horizonte del sedimento. Se seleccionó para la primera submuestra un punto de fácil acceso y de posible sedimentación, las sucesivas submuestras se tomaron, cada 2 metros aproximadamente hasta completar los 3L necesarios. Se emplearon dos herramientas para recolectar el sedimento según la dificultad de acceso (pala de mano jardinería y corer). Cada submuestra se colocó en una bandeja, se mezcló para homogeneizar las muestras y se realizó una primera limpieza retirando las piezas grandes de material vegetal y otros desechos, tales como rocas y vidrio. Las muestras fueron guardadas en bolsas de polipropileno y en heladeras portátiles para su traslado. En el laboratorio las muestras se mantuvieron hasta su utilización en bolsas negras (oscuridad) y 4 ° C.

3.2.2 Organismos Prueba

Las larvas y embriones de *Rhinella arenarum* y *Boana pulchella* utilizados para los ensayos fueron obtenidos a partir de puestas colectadas en los sitios de referencia. Las puestas se colectaron siguiendo dos procedimientos propuestos por Natale (2006): 1- Recolección directa: tomando porciones (de aproximadamente el 10% de cada puesta) de puestas diferentes recién colocadas en el ambiente 2- Colecta de amplexos: Colocando amplexos colectados en el campo en frascos de vidrio con agua de la charca y soporte vegetal, hasta detectar las oviposturas.

Las puestas se trasladaron al laboratorio empleando bolsas de polipropileno junto con el agua circundante y el soporte vegetal. Una vez allí, se revisaron los embriones y se determinó el estadio de desarrollo, se desecharon los huevos que no eran viables y se retiraron los depredadores presentes en las mismas (hirudíneos, larvas de insectos, otros). Posteriormente se colocaron en bateas de 45L donde fueron mantenidos hasta el momento de su utilización en las siguientes condiciones controladas de laboratorio: Período de luz:oscuridad (16:8), con agua de bioensayo (agua de red previamente filtrada por filtro físico Aqua-Pure® de 5 µ Modelo AP-110 H/C y aireada por 48 h enérgicamente con el objetivo de eliminar el cloro); temperatura aire-agua, 25 ± 1 °C; pH = $7,6 \pm 0,1$; oxígeno disuelto, $7,7 \pm 0.3$ mg/l; conductividad, 1025 ± 15 µS/cm; dureza, 181 ± 35 mg/l CaCO₃; burbujeo en bateas, constante 90 burbujas/min).

3.2.3 Adecuación del protocolo para las especies de estudio.

Los bioensayos se realizaron siguiendo los protocolos estandarizados para *Lithobates Picipens* (ASTM, 2007) y (USEPA, 1996) realizando algunas modificaciones vinculadas con las especies de estudio. Las condiciones de ensayos con las modificaciones pueden verse resumidas en la tabla 3.2, las explicaciones y fundamentos de algunos cambios, así como los criterios empleados se detallan en el anexo III junto con el protocolo final propuesto.

Cada unidad experimental consistió en colocar en un frasco de vidrio de 1500 ml 200 ml de sedimento y 350 ml de agua de red de clorada (pH=7,5; dureza=220±20 mg CaCO₃.L-1; oxígeno disuelto=9±1 mg. L-1; conductividad=1,00±0,20 mS.cm-1) y se dejó reposar 24 h según protocolo hasta que se estabilizaron las condiciones fisicoquímicas. Estas condiciones fueron consideradas como representativas de las condiciones que se establecen en el campo, mediante el intercambio entre las fases sedimento y agua, motivo por el cual todas las mediciones fisicoquímicas mencionadas más adelante se realizaron en laboratorio bajo condiciones controladas. La Figura 3.2 ilustra el cuarto de ensayo, la preparación de los sedimentos y la cámara de cría.



Figura 3.2 A- Cuarto de ensayo donde se realizaron los experimentos con las cámaras de ensayo. B- Homogeneización del sedimento. C- cámaras de ensayo con sedimento.

Tabla 3.2. Resumen de las condiciones experimentales establecidas para la realización de los bioensayos realizados con larvas de *Boana pulchella* (Bp) y *Rhinella arenarum* (Ra).

Condiciones de ensayo	Bp y Ra
Tipo de bioensayo	Bioensayo de toxicidad con sedimento completo
Duración	10 días
Temperatura	21 ± 1°C
Fotoperíodo	16h Luz:8h Oscuridad
Calidad de luz	Tubo de luz, 100-1000 lux
Cámara de ensayo	Frascos de vidrio 500 ml
Réplicas	6 unidades experimentales
Volumen de sedimento	200 ml
Volumen de agua	350 ml
Renovación de agua	Parcial, cada 48h
Calidad del agua	Agua de red declorinada por aireación. Dureza= 115 ± 33 mg CaCO ₃ /L; Alcalinidad = 115 ± 5; Oxígeno disuelto = 7.0 ± 1.0 mg/L; conductividad = 1.16 ± 0.08 mS/cm; pH = 8.1 ± 0.2; Temperatura = 21 ± 1°C
Organismos por cámara	10
Edad	10 días
Estadio del desarrollo	Estadio 25 de Gosner
Alimentación	Alimento balanceado para peces en escamas Tetramin® por día
Aireación	Sin aireación
Puntos finales	Mortalidad, crecimiento, comportamiento, desarrollo y anomalías morfológicas
Aceptabilidad	Supervivencia de los controles por encima del 80%

Una vez establecido el protocolo se puso a prueba mediante la realización de 15 ensayos, los que permitieron evaluar su utilidad y realizar ajustes y mejoras.

Una de las variaciones del protocolo, consistió en realizar bioensayos empleando estadios más tempranos del desarrollo como lo es el estadio 8 (blástula con segmentación media), considerando que una exposición en etapas iniciales del desarrollo aumentaría la probabilidad de ocurrencia de malformaciones, lo que provocaría un aumento no solo en el número (frecuencia de ocurrencia), sino en la gravedad o relevancia de las anomalías evaluadas. En este sentido se recolectó un mayor número de porciones de puestas a campo (10% de aproximadamente 6 puestas) con la intención de lograr una mayor representatividad genética de la población y mayor cantidad de sedimento. Las puestas fueron transportadas y aclimatadas en el laboratorio al igual que los sedimentos, como se indicó anteriormente.

Por otro lado, para evaluar la sensibilidad a lo largo del ciclo larval, se seleccionaron tres etapas del desarrollo, las que se iniciaban con los estadios de desarrollo 8, 25 y 30. Se recolectó un mayor número de porciones de puestas a campo (10% de aproximadamente 6 puestas) y mayor cantidad de sedimento. Las larvas fueron transportadas y aclimatadas en el laboratorio al igual que los sedimentos, como se indicó anteriormente. Cuando los embriones llegaron al estadio EG 8 se largó el primer ensayo siguiendo el protocolo anteriormente mencionado, utilizando 20 embriones por unidad experimental. El segundo ensayo se largó cuando las larvas llegaron al estadio 25, haciendo un recambio parcial del sedimento (50%) y recambio total de agua sobrenadante, y siguiendo el procedimiento según protocolo. Por último, se realizó un tercer experimento cuando las larvas estuvieron en estadio 30 se repitió el procedimiento reemplazando el 50% del sedimento y el 100% del agua sobrenadante.

La toxicidad crónica de los sedimentos se evaluó considerando recomendaciones del protocolo OECD, (2009). Los embriones fueron puestos en las cámaras de ensayo en el estadio 8, siguiendo los procedimientos explicados anteriormente. Cada 15 días los renacuajos fueron medidos y pesados con las técnicas descritas en el siguiente apartado. Cuando los individuos llegaron al estadio 44 se los aisló de manera individual en recipientes de polipropileno con agua sobrenadante de las cámaras de ensayo y se agregaron piedras de granito como sustrato, para evitar que se ahoguen hasta que presentaron la reabsorción total de la cola, momento en el cual se procedió a pesarlos, medirlos, anestésiar y fijarlos según técnicas descriptas a continuación. El ensayo se dio por finalizado cuando todos los individuos alcanzaron la metamorfosis.

Otra de las variantes implementadas, se aplicó en los casos que los sedimentos presentaran mortalidad de 100%, en estos casos se realizaba un nuevo ensayo inmediatamente después de registrar este resultado. Se procedió a realizar diluciones del sedimento en cuestión con sedimento del sitio de referencia en un gradiente de concentración (0%; 6,5%; 12,5%; 25%; 50%; 75%; 100), posteriormente se continuó con los procedimientos establecidos anteriormente.

3.2.4 Puntos Finales Evaluados (Puesta a punto, prueba y selección de puntos finales).

La mortalidad se evaluó por observación directa cada 24 h siguiendo los criterios descritos por Natale *et al.* (2006) y Pérez Iglesias *et al.* (2014), para *H. curvispina* se siguió a Peluso *et al.* (2011). Al finalizar el ensayo, todos los individuos fueron fijados en formaldehído al 10% para evaluaciones detalladas adicionales.

El crecimiento fue evaluado a los 10 días de exposición, midiendo la longitud del cuerpo, la longitud total y el ancho de cada individuo mediante el programa ImageJ de acuerdo a descripciones de McDiarmid y Altig (1999) mientras que para *H. curvispina* se siguió a Peluso *et al.* (2011).

Las alteraciones en la natación fueron registradas cada 24 Hs. Los cambios se observaron después de girar suavemente el agua cinco veces con una varilla de vidrio y observar durante 1 minuto la actividad de natación de cada individuo. La natación irregular (IS) y la inmovilidad (IM) se clasificaron de acuerdo con las descripciones hechas por Brunelli *et al.* (2009) según modificaciones realizadas por Pérez Iglesias *et al.* (2015).

La inhibición del desarrollo y la presencia de anomalías se evaluaron sobre cada uno de los individuos fijados a los diez días de exposición, mediante inspección en una lupa estereoscópica marca Ahecro modelo ZTX-3EI. El estadio de desarrollo se determinó utilizando la clasificación propuesta por Gosner (1960). Las anomalías se clasificaron siguiendo la lista de anomalías propuesta en el Capítulo 2 .

3.2.5 Control de la calidad del agua y sedimentos

En cada cámara de ensayo se midió oxígeno disuelto, conductividad, pH y temperatura empleando un equipo portátil multiparamétrico modelo WA-2017SD. Además, se determinó la alcalinidad por titulación ácido base de acuerdo con el método 2320 (APHA, 1998), expresando los resultados en mg CaCO₃.L-1 y dureza por titulación con EDTA, de acuerdo al método 2340C (APHA, 1998), expresando los resultados en mgCaCO₃.L-1. En los sedimentos se determinó el contenido de materia orgánica (MO) por calcinación (pérdida por ignición, LOI) en una mufla a 550 °C (APHA, 1998; Heiri *et al.*, 2001). En algunas muestras de sedimento se realizaron determinaciones de concentración de plaguicidas mediante la extracción a través del procedimiento de QuEChERS modificado, donde 7 gramos de sedimento húmedo se extrajeron con una solución de 15 mililitros de acetonitrilo, 2 gramos de NaCl y 6 gramos de MgSO₄ anhidro; y análisis cromatográfico por GC-MS-TOF siguiendo Mac Loughlin *et al.* (2017). Para el resto de los ensayos los resultados fueron discutidos en función de los contaminantes detectados en las zonas de estudio en la bibliografía disponible (Ver Capítulo 1 - Tabla 1.5)

3.2.6 Análisis estadístico asociado con los bioensayos

Las condiciones del agua de ensayo fueron analizadas aplicando estadística descriptiva.

Los datos de proporciones de mortalidad, actividad natatoria y las frecuencias de ocurrencia de anomalías fueron transformados angularmente y, luego de la verificación de supuestos, se realizaron análisis de varianza de un factor (ANOVA) entre los diferentes sitios, seguido de la prueba de Dunnett.

La longitud y peso de los individuos fueron analizados con estadística descriptiva y se comparó mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett. Los supuestos de normalidad y homoscedasticidad se verificaron para todos los casos empleando las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. En los sitios que presentaron mortalidades significativas de las larvas se graficaron las curvas de mortalidad a largo del tiempo. Los estadios de desarrollo presentes en los renacuajos fueron analizados mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis con posterior prueba de comparación múltiple para establecer diferencias significativas entre los sitios siguiendo procedimiento detallados en (Zar, 2013). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R (R Core Team, 2013). El nivel de significancia establecido fue de 0,05 para todos los casos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Condiciones de ensayo

Los procedimientos y metodologías propuestas como parte del protocolo desarrollado para llevar a cabo los bioensayos pudieron ser concretados de manera satisfactoria. El protocolo propuesto y las variantes aplicadas a la metodología permitieron cumplir los objetivos planteados y responder las preguntas de investigación. Las larvas de las dos especies de estudio en los diferentes estadios evaluados respondieron de manera satisfactoria, cumpliendo con los criterios de aceptabilidad establecidos previamente. A continuación, se detallan algunos aspectos vinculados con las condiciones establecidas para el desarrollo y ejecución de los bioensayos, y las variaciones propuestas respecto del protocolo propuesto.

Los criterios de aceptabilidad establecidos se cumplieron en la totalidad de las pruebas realizadas. El control de agua sin sedimento no presentó evidencias de efecto, si bien los individuos presentaron pesos y tamaños menores al resto de los tratamientos, debido a la ausencia de sedimento, el que suele constituir un aporte de alimento extra al otorgado diariamente, los individuos se desarrollaron sin inconvenientes. La supervivencia de los individuos expuestos a sedimentos de sitios de referencia fueron superiores al 80% en todos los casos. El oxígeno disuelto, del agua suprayacente de la mayoría de los tratamientos estuvo en o por encima de los niveles aceptables (es decir, 2,5 mg O₂/ L), en los casos en que las concentraciones de oxígeno fueron menores, se realizaron cambios de agua cada 24 hs. La

dureza y alcalinidad no presentaron diferencias significativas entre los valores presentados al inicio y al final de los bioensayos para la mayoría de los tratamientos, lo que evidencia estabilidad en las condiciones del bioensayo. En el anexo IV se presentan los valores de los parámetros medidos en el agua sobrenadante para todos los ensayos.

La alternativa de utilizar un sistema de aireación continua en las cámaras de ensayo presentó en relación directa con la infraestructura presente en el laboratorio, un limitante en la cantidad de cámaras de ensayos a utilizar (máximo 60), además de la dificultad en la regulación de la salida de aire de manera tal que fuera igual en todos los tratamientos, y su control de manera precisa. A esto se sumaba el hecho que el burbujeo continuo producía la re-suspensión de partículas de sedimento, con la consecuente modificación de parámetros fisicoquímicos, lo que se evidenció al comparar las condiciones iniciales y finales de ensayo. Por estas razones la realización de recambio parcial de agua sobrenadante cada 24 y/o 48 hs, resultó ser la mejor alternativa para mantener los parámetros de calidad de aire en niveles aceptables, permitiendo realizar bioensayos con todos los tratamientos y un número de réplicas apropiado (máximo 126 cámaras de ensayo).

El empleo de cámaras de prueba de vidrio de 1500 ml de capacidad, permitieron duplicar la cantidad de agua y sedimento establecida originalmente, y de este modo mantener una densidad óptima de individuos no solo en cuanto a cuestiones bioecológicas, sino también a cuestiones ecotoxicológicas como lo es el concepto de carga (gramos de biomasa/L de agua), ambos recomendados para el buen desarrollo y supervivencia de las larvas, así como también por respetar criterios de los protocolos normalizados preexistentes..

Las variaciones en el procedimiento establecido vinculadas con el empleo de embriones (ensayos en estadio 8 EG), fueron realizadas con la intención de lograr una evaluación más realista al considerar lo que sucede en el ambiente, considerando la exposición de una etapa sensible como lo es la embriogénesis. En relación con las características morfológicas y la dinámica del desarrollo embrionario, resultó conveniente utilizar el doble de organismos por cámara de prueba (n=20). El hecho de aumentar el número inicial de individuos por cámara de prueba se vincula con la necesidad de garantizar un número adecuado de individuos para cumplir con los requisitos de las pruebas estadísticas considerando la elevada tasa de mortalidad en esta etapa. Por otro lado, debido a la morfología presentada en esa etapa y la falta de movilidad, existe una baja confiabilidad al momento de determinar la viabilidad de los embriones y su posterior supervivencia (al menos en las primeras 72 horas). Asimismo, la lectura de la mortalidad de los individuos en esa etapa resultó dificultosa, por lo que se decidió realizarla de manera detallada a partir del tercer día de exposición cuando los individuos llegan al EG18, presentan movilidad y una forma más definida que permite distinguir claramente entre individuos vivos y muertos.

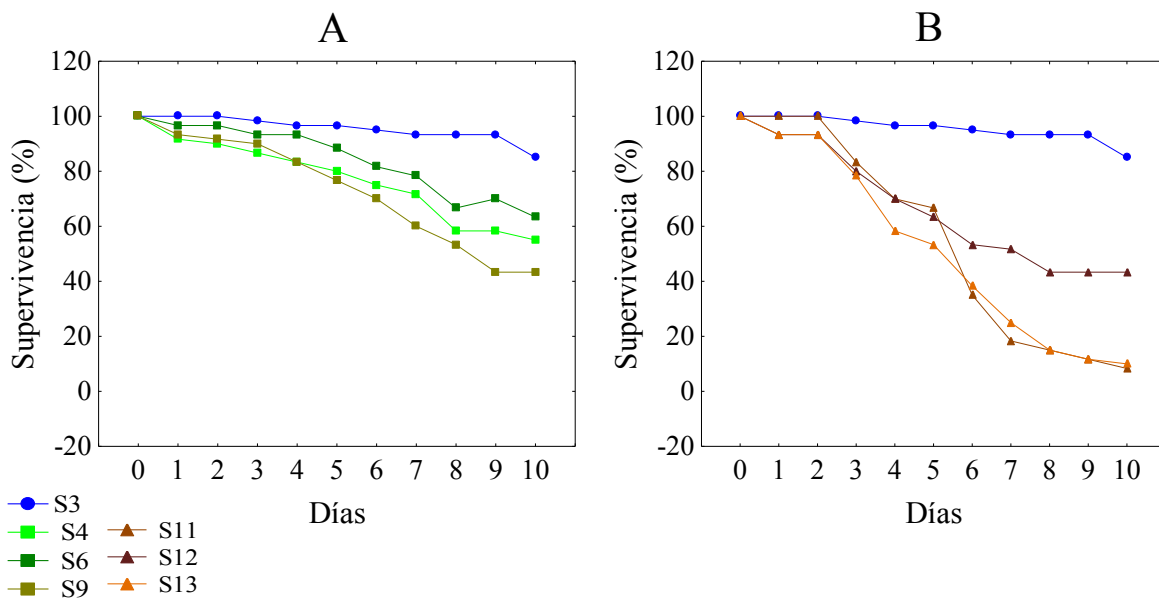
3.3.2 Bioensayos de toxicidad aguda con sedimento completo EG25

Boana pulchella

Se realizaron tres ensayos con *B. pulchella* en EG25. Los resultados de las pruebas de significancia, tablas resumen de ANOVA, y la información de los análisis realizados se presentan en el anexo 4, con la intención de facilitar la lectura de este capítulo.

Los resultados obtenidos para el punto final mortalidad indicaron efectos en el 35% de las muestras analizadas, presentando mortalidades significativamente mayores ($p < 0,05$) a las observadas en los sitios de Referencia en al menos una de las muestras de las problemáticas Agrícola, Urbana e Industrial.

En la Figura 3.3 se presentan los resultados en detalle para los sitios que presentaron mortalidades significativas. Los resultados permiten distinguir que el mayor porcentaje de mortalidad (100% de los individuos) se observó en muestras provenientes de la problemática Industrial, las mismas sucedieron tempranamente, entre el 2do y 5to día de exposición. Se observaron además mortalidades del 70 al 90% de los individuos expuestos a sedimentos provenientes de la problemática Urbana, y del 40 al 80% en sedimentos asociados con la problemática Agrícola siendo estas significativas a partir del 4to y 6to día de exposición.



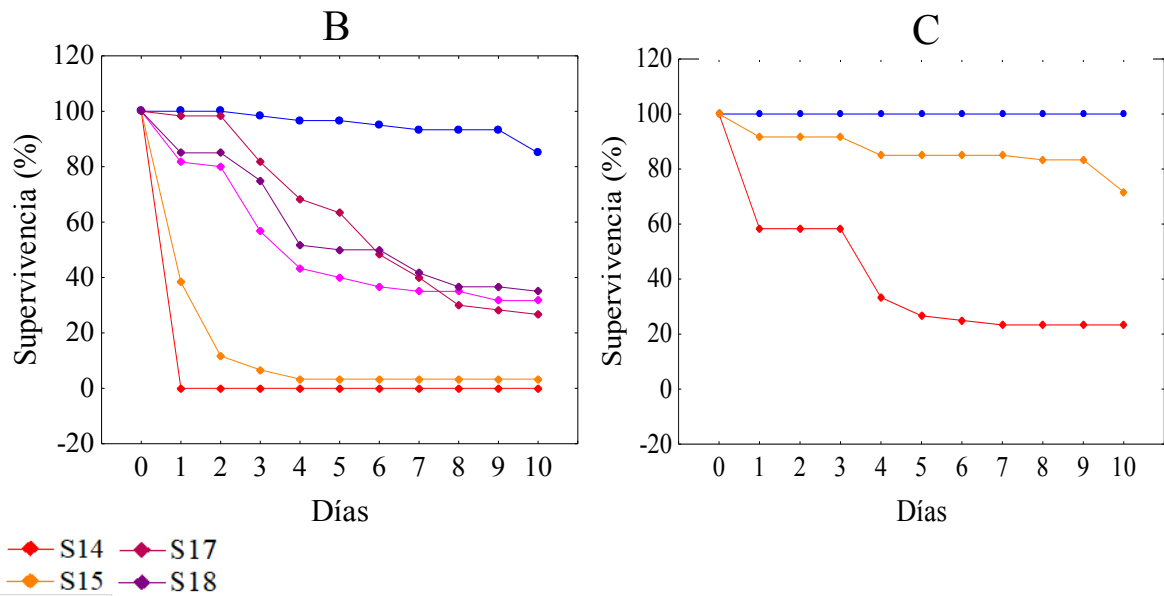


Figura 3.3-Curvas de supervivencia para los individuos de *B. pulchella*, expuestos desde el EG25. A- Supervivencia de individuos expuestos a sedimentos de la problemática Agrícola. B- Supervivencia de individuos expuestos a sedimentos de la problemática Urbana. C y D Supervivencia de individuos expuestos a sedimentos de la problemática industrial para diferentes ensayos.

Los diferentes puntos finales subletales evaluados permitieron evidenciar toxicidad para la totalidad de las muestras de sedimentos de las problemáticas evaluadas.

Al evaluar el crecimiento de los individuos se evidenció, por un lado, una marcada inhibición del crecimiento en 11 de las muestras evaluadas, de las cuales 4 se corresponden con la problemática agrícola, 4 con la problemática industrial y 3 muestras con la problemática urbana. Por otro lado, un resultado llamativo fue el hecho que evidenció un aumento significativo del crecimiento de los individuos expuestos a sedimentos correspondientes a la problemática urbana y de descargas cloacales.

Con respecto a la evaluación de alteraciones en la actividad natatoria y las etapas del desarrollo, no se encontraron diferencias significativas entre los individuos expuestos a las muestras provenientes de las diferentes problemáticas ambientales y las muestras de referencia.

El análisis de la presencia de anomalías morfológicas, permitió observar un total de 7 tipos de anomalías (Figura 3.4) a saber: Flexión de la cola, Ausencia de queratodontes, Edemas, Aire subcutáneo (cuerpo hinchado), Intestino desplazado, Hipopigmentación y Cuerpos asimétricos. Estas anomalías fueron detectadas en el 11, 20% de los individuos observados (N = 1642).

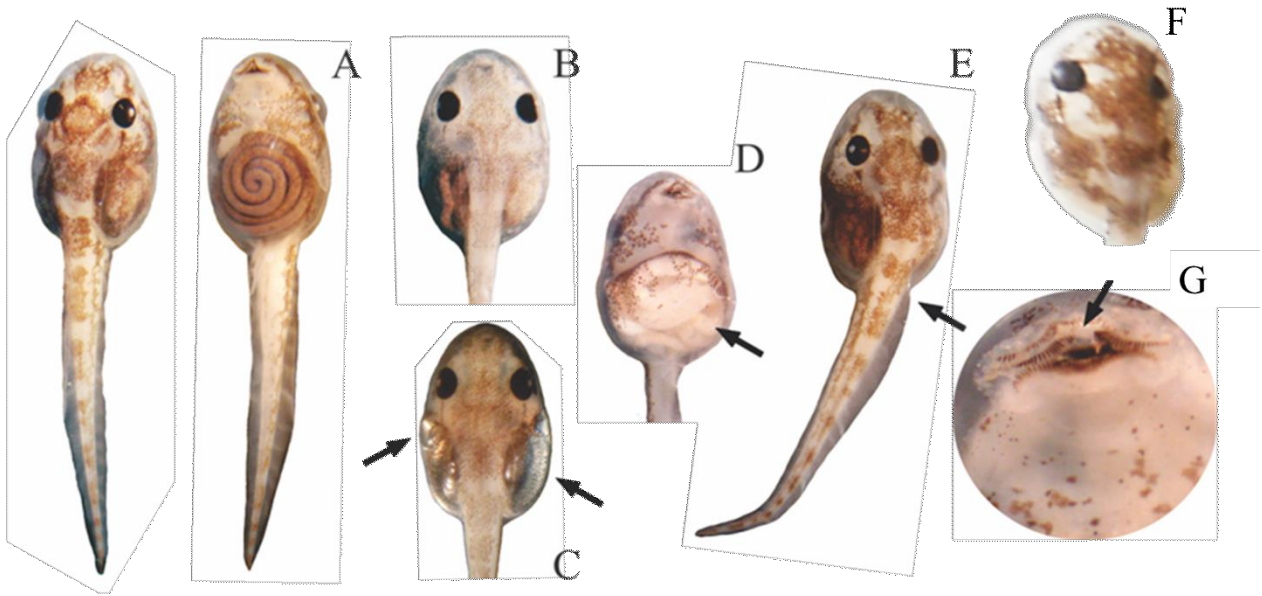


Figura 3.4- Anormalidades morfológicas detectadas en renacuajos de *B. pulchella*. A, renacuajo normal sin anormalidades morfológicas B, hipopigmentación; C, presencia de aire subcutáneo (flechas); D, intestino desplazado (flecha); E, flexión de la cola (flecha), F cuerpo asimétrico; G, ausencia de queratodontes (flecha).

El análisis cuantitativo de las anormalidades permitió determinar toxicidad en 7 de las muestras evaluadas. De las cuales 3 muestras corresponden a la problemática agrícola, 2 muestras a la problemática urbana y 2 muestras a la problemática industrial. Cabe destacar que en tres de estas muestras (dos de la problemática agrícola y una de la problemática industrial) no se habían detectado efectos letales ni en la inhibición del crecimiento, lo que resultó un hallazgo relevante e incentivador.

Entre las anormalidades encontradas, las más frecuentes fueron la presencia de individuos con flexión en la cola, ausencia de queratodontes, hipopigmentación e intestinos desplazados. Es importante resaltar que, en coincidencia con los resultados obtenidos en el capítulo anterior, no se obtuvieron evidencias que indiquen asociación entre el tipo de anormalidad y/o su frecuencia de expresión con alguna problemática. Asimismo, se puede mencionar que la presencia de individuos con aire subcutáneo (cuerpo hinchado), sólo se registró en individuos expuestos a sedimentos de la problemática agrícola, presentando diferencias significativamente altas en una muestra correspondiente al sitio 5.

Las muestras de las problemáticas agrícola fueron las que presentaron un mayor tipo de anormalidades siendo estas, hipopigmentación, ausencia de queratodontes, cuerpo hinchado, flexión de la cola, e intestinos desplazados. Como se explicó en el capítulo 2 estas anormalidades se asocian con un alto riesgo para la supervivencia de los individuos tanto de forma directa, por ejemplo, impidiendo obtener una alimentación adecuada (ausencia de queratodontes e intestinos desplazados), así como también indirectamente, al provocar

alteraciones que dejan a los individuos más propensos a ser presas para los depredadores (Flexión de la cola, cuerpo hinchado, hipopigmentación), algunas de ellas vinculadas con una disminución de la performance natatoria. Por otro lado, las muestras de la problemática urbana provocaron en los individuos pérdida de queratodontes e hipopigmentación, estas anormalidades fueron clasificadas oportunamente, como de baja y mediana severidad ya que los individuos podían alimentarse normalmente y esto no presentaba un riesgo para la supervivencia a la metamorfosis. Los sedimentos de la problemática industrial provocaron la expresión de individuos con intestinos desplazados. Estas anormalidades fueron clasificadas como severas, ya que el grado de enrollamiento y desplazamiento de los intestinos era tal que se infiere que los individuos afectados no podían asimilar el alimento correctamente, lo que los afectaría en numerosos procesos metabólicos, que culminarían en la muerte.

Considerando la totalidad de los puntos finales evaluados, estos permitieron detectar toxicidad en las diferentes muestras evaluadas. Los sedimentos más tóxicos provocaron mortalidades elevadas a los pocos días de exposición, en los casos en que la mortalidad no fue tan elevada se pudieron observar efectos subletales como inhibición del crecimiento y expresión de anormalidades. Es relevante destacar en relación al propósito de la investigación que en algunos casos las anormalidades (expresión o presencia de distintos tipos) se registraron en muestras de sedimentos que no habían presentado efectos letales o subletales de otro tipo.

Rhinella arenarum

La evaluación de la toxicidad de las muestras empleando el punto final mortalidad permitió determinar toxicidad en el 20 % de las muestras, las cuales corresponden a la problemática urbana e industrial.

En la figura 3.5 se presentan los resultados para los sitios que presentaron mortalidades significativas respecto de los sitios de referencia.

Los resultados permitieron distinguir que el mayor porcentaje de mortalidad (100% de los individuos) se observó en muestras de la problemática industrial. Se observó además mortalidades del 30% de los individuos, en tratamientos de la problemática urbana. Las mortalidades fueron significativas ($p < 0,05$) a partir del segundo y décimo día de exposición respectivamente. No se observaron mortalidades significativas en los individuos expuestos a sedimentos de la problemática agrícola.

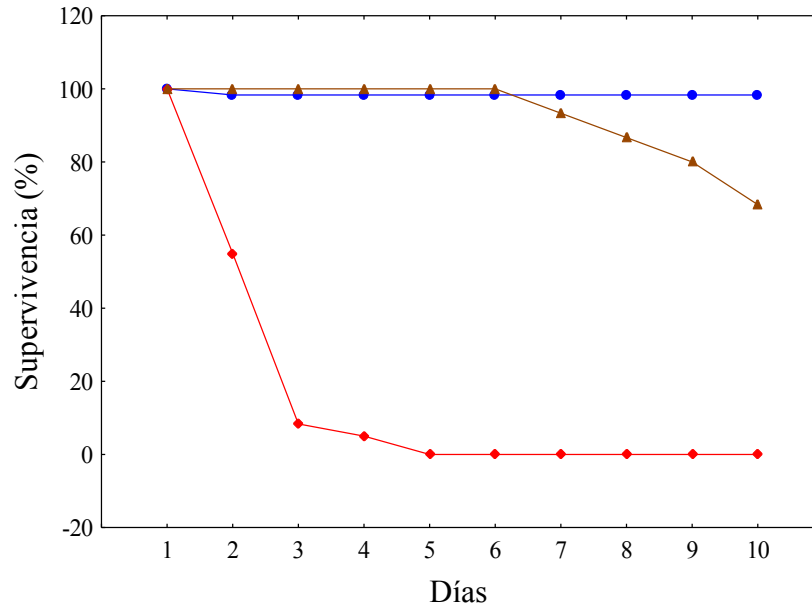


Figura 3.5-Curvas de supervivencia para los individuos expuestos al sitio 2 de referencia (Línea Azul), el sitio 14 de la problemática industrial (Línea roja) y al sitio 11 de la problemática urbana (Línea marrón).

Los diferentes puntos finales subletales evaluados permitieron evidenciar toxicidad para 8 muestras de sedimentos de las problemáticas evaluadas.

Los resultados de la evaluación del punto final crecimiento de los individuos se evidenció, por un lado, una marcada inhibición del crecimiento en 5 de las muestras las cuales se corresponden con la problemática agrícola (3 muestras), industrial (1 muestra) y urbanas (1 muestra). Por otro lado, se evidenció un aumento significativo del crecimiento en los individuos expuestos a sedimentos de uno de los sitios asociado con la problemática de descargas cloacales. Cabe destacar que estos mismos resultados se observaron al evaluar la toxicidad de muestras de los mismos sitios con la especie *B. pulchella* EG25 (ver ensayo anterior).

Con respecto a las alteraciones en las etapas del desarrollo, se pudo evidenciar un aumento significativo del desarrollo en los individuos expuestos a tres tratamientos correspondientes a las problemáticas agrícola, urbana y de descargas cloacales, en este último caso el resultado se corresponde con el aumento significativo del crecimiento de los individuos (nombrado previamente).

Por otro lado, mediante el análisis de las alteraciones en la actividad natatoria pudimos detectar toxicidad en una de las muestras de la problemática urbana, estos individuos además de no responder a los estímulos de manera normal, al hacerlo realizaban movimientos natatorios circulares en el lugar.

El análisis de la presencia de anomalías morfológicas, permitió determinar la expresión de 4 tipos de anomalías (Figura 3.6): a saber: concavidad ventral, intestino desplazado, ausencia de queratodontes, ausencia de pico córneo. Estas anomalías fueron detectadas en el 31,52% de los individuos observados (N=720).

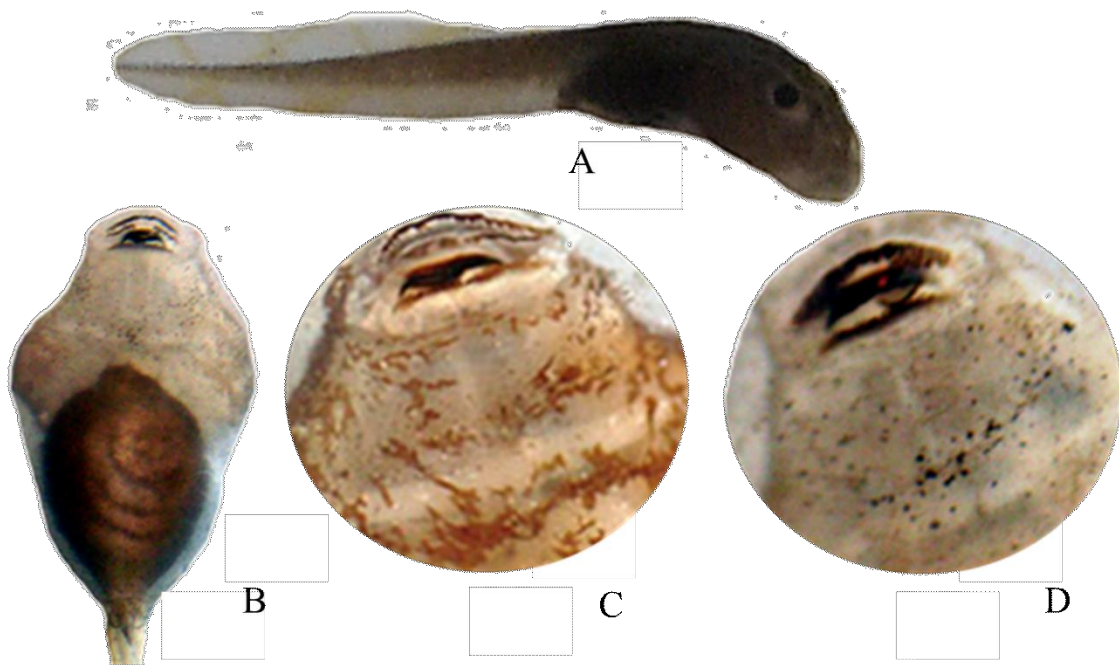


Figura 3.6- Anormalidades registradas en los sitios 10 y 11 (problemática Urbana) A: cuerpo cóncavo ventralmente; B: intestino desplazado; C Ausencia de queratodontes, D Ausencia de Pico Córneo.

El análisis cuantitativo de las anomalías permitió determinar toxicidad en dos de las muestras evaluadas correspondientes a la problemática urbana.

Entre las anomalías encontradas, las más frecuentes fueron la presencia de individuos con intestinos desplazados y ausencia de queratodontes. Si bien en este ensayo las anomalías solo se detectaron en individuos expuestos a sedimentos provenientes de los sitios urbanos, estas mismas anomalías fueron detectadas en otras muestras correspondientes a problemáticas agrícolas e industriales en ensayos utilizando la especie *Boana pulchella*, por lo tanto, estas anomalías no se considerarán como específicas para la problemática urbana.

La muestra proveniente del sitio 11 de la problemática urbana provocó estos cuatro tipos de anomalías. Como se explicó en el capítulo 2 la anomalía más severa de estas cuatro, es el desplazamiento de los intestinos (intestino desplazado). En estos casos, el grado de enrollamiento y desplazamiento de los intestinos fue clasificado como leve, ya que se infiere que podían asimilar el alimento correctamente, pero algunos individuos presentaron una

reducción significativamente mayor, la que además provocaba que la pared ventral del cuerpo se invaginara formando la anormalidad que denominamos “cuerpos cóncavos ventralmente,” agravando el estado de salud de los individuos. Por otro lado, la ausencia de queratodontes se clasificó con una severidad baja cuando los individuos podían alimentarse normalmente, pero sumado a esta alteración se encontraron individuos con ausencia de pico córneo los cuales no se alimentaban correctamente. Es evidente que estas anormalidades están relacionadas y puede que la presencia de alguna de ellas influya en la manifestación de otras, pero para ello se necesitan estudios detallados. En las muestras del sitio 10 de la problemática urbana, se observaron individuos con intestinos desplazados, en los cuales al analizar estos casos en profundidad, se notaba que el desplazamiento y enrollamiento de los mismos no era tan grave, pudiéndose observar restos de comida dentro del intestino, y aparentemente los individuos se alimentaban sin inconvenientes por lo que se clasificó a esta anormalidad como de baja severidad.

Al considerar los resultados obtenidos del empleo de los puntos finales evaluados, podemos concluir que estos son útiles al momento de determinar toxicidad de muestras de sedimentos provenientes de ecosistemas acuáticos afectados por diversas actividades antrópicas y que conllevan matrices fisicoquímicas complejas vinculadas con contaminación de origen múltiple. En todas las muestras evaluadas se observó algún efecto significativo.

Las muestras de sedimento que resultaron más tóxicas provocaron mortalidades del 100% de los individuos a los pocos días de exposición. En el caso en que la mortalidad no alcanzó el 100%, pero fue significativamente mayor a los grupos de referencia, se pudieron observar además de los efectos letales en bajas proporciones, efectos subletales como inhibición del crecimiento, alteraciones en la natación y presencia de anormalidades. Por otro lado, en los sitios que no se logró determinar toxicidad al evaluar mortalidad (ya que la misma no fue significativa) la evaluación de puntos finales subletales permitió determinar toxicidad de las muestras.

Comparación del protocolo propuesto para *B. pulchella* con el ensayo de *H. Curvispina*

La especie *H. curvispina* presentó diferencias significativas en la mortalidad al ser expuesta a sedimentos del sitio 5 ($F [5,18] = 11.500, p < 0,001$), además evidenció inhibición del crecimiento significativo al ser expuesta a los sitios 6,7 y 8 ($F [3,117] = 10,142 p < 0,005$). Estos resultados son acordes con los observados para *B. pulchella* la cual, si bien no presentó mortalidades significativas, evidenció inhibición significativa del crecimiento al ser expuesta a sedimentos del sitio 5 y presencia significativa de anormalidades en los sitios 7 y 8.

Por lo tanto, se pudo observar una respuesta acorde y complementaria al comparar los resultados del bioensayo utilizando larvas de *B. pulchella* respecto de un ensayo

estandarizado de referencia utilizando *H. curvispina*. En la figura 3.7 se muestra la comparación de la sensibilidad de *Hyallela curvispina* (caja rayada) y *Boana pulchella* (caja gris) considerando la inhibición del crecimiento y la mortalidad.

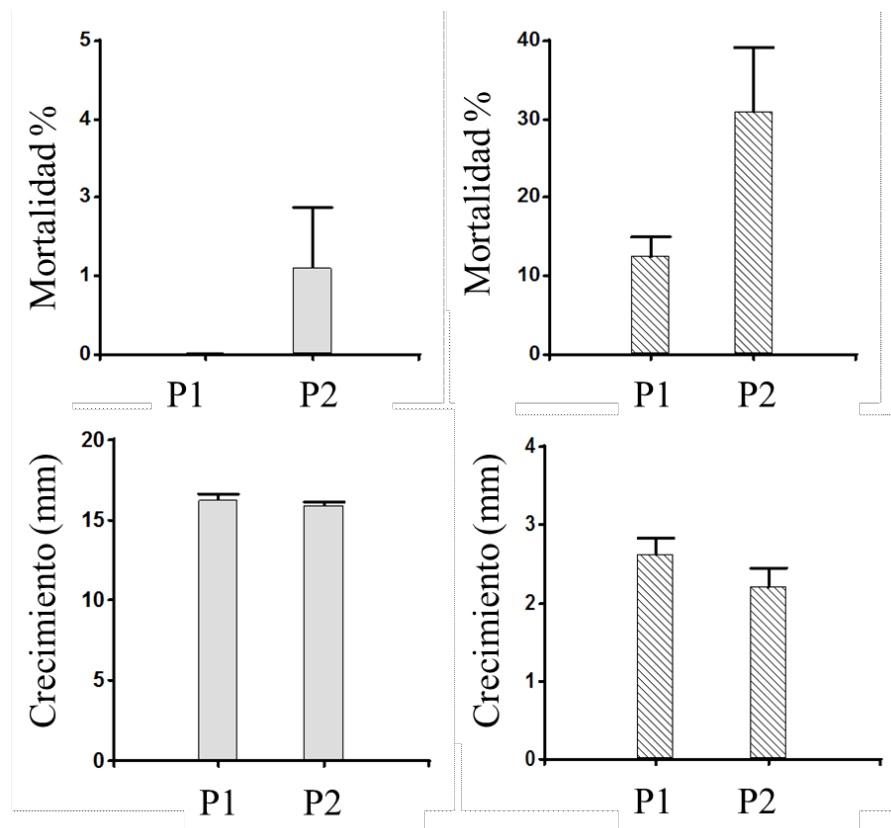


Figura 3.7 -Comparación de la sensibilidad de *Hyallela curvispina* (caja rayada) y *Boana pulchella* (caja gris) considerando la inhibición de la mortalidad y el crecimiento (en milímetros). Los valores proporcionados son medias \pm error estándar por problemática. P1: Referencia de La Plata; P2: Problemática Agrícola.

3.3.3 Bioensayos de toxicidad aguda con sedimentos empleando embriones (EG8)

Tal como se mencionó anteriormente la utilización de embriones de ambas especies como una variante para el protocolo propuesto, y las modificaciones realizadas para garantizar el buen desarrollo del ensayo, resultó satisfactoria y permitió obtener información relevante y suficiente para alcanzar los objetivos planteados. Por otra parte, aportó información complementaria a la obtenida al realizar los ensayos EG25. En particular esta variante que implica la exposición temprana de los embriones provoca un aumento en la sensibilidad de la herramienta asociada con la expresión de anomalías, siendo este el punto final de mayor interés en este trabajo de tesis.

*Bioensayos con embriones de *Boana pulchella* EG8*

La evaluación de la toxicidad de las muestras empleando el punto final mortalidad permitió determinar toxicidad en el 53 % de las muestras, las cuales corresponden a las problemáticas agrícola (2 muestras), urbana (1 muestra), industrial (3 muestras) y descargas cloacales (1 muestra), permaneciendo los sitios de referencia sin expresión de efectos. Los resultados permiten distinguir que la mortalidad para los sitios antes mencionados fue del 100% de los individuos a partir del tercer día de exposición.

En la figura 3.8 se presentan los resultados para los sitios que presentaron mortalidades significativas.

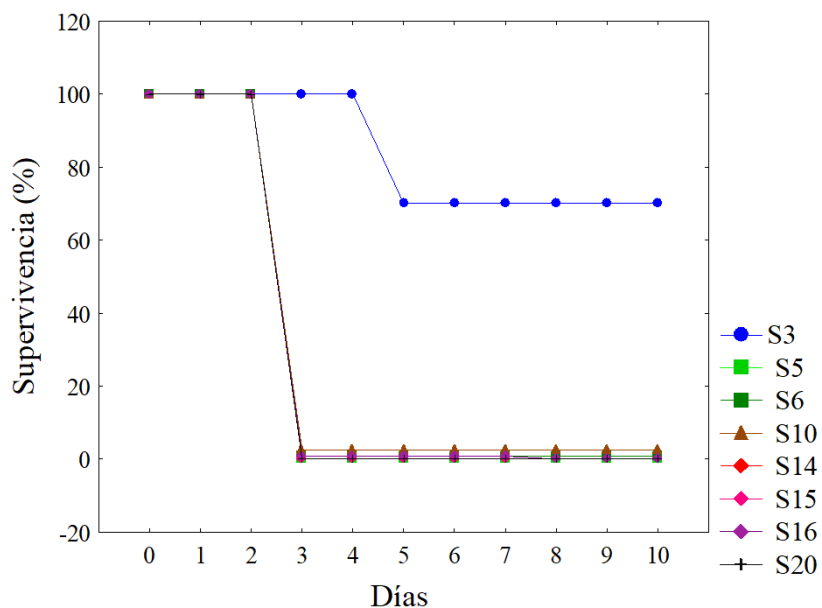


Figura 3.8-Curvas de supervivencia de los individuos expuestos al sitio de referencia y a los sitios que presentaron mortalidades significativamente mayores que los sitios de referencias, para el ensayo de *Boana pulchella*, expuestos en EG8.

Los diferentes puntos finales subletales evaluados permitieron evidenciar toxicidad para 4 muestras de sedimentos de las problemáticas agrícola, urbana e industrial.

El resultado obtenido del análisis del crecimiento de los individuos evidenció una marcada inhibición del crecimiento en 4 de las muestras las cuales se corresponden con la problemática agrícola (1 muestra), industrial (2 muestras) y urbana (1 muestra). A diferencia de los resultados obtenidos en los bioensayos de EG25 con estas mismas muestras, no se observó aumento significativo en el crecimiento de los individuos, lo que puede asociarse con la expresión de altas mortalidades, que indican mayor toxicidad relativa de las muestras.

En cuanto a la evaluación de los puntos finales desarrollo y actividad natatoria de los individuos, no se observaron diferencias significativas con respecto al sitio de referencia (S3).

El análisis de la presencia de anomalías morfológicas permitió observar un total de 6 tipos de anomalías (Figura 3.9), a saber: flexión de cola, intestino desplazado, ausencia de queratodontes, edemas, anomalías en la disposición de los ojos y cuerpo asimétrico. Estas anomalías fueron detectadas en el 5,58% de los individuos observados (N total= 890).

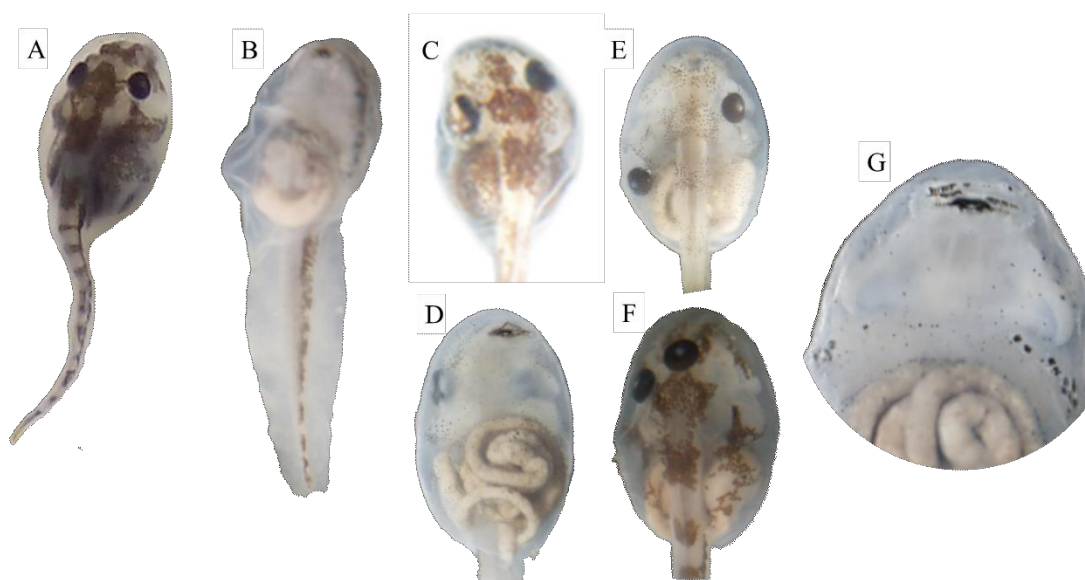


Figura 3.9. Anormalidades registradas para individuos de *B. pulchella* EG8. A- Flexión de la cola, B-Edema; C- Cuerpo asimétrico; D-Intestino desplazado; E-F Anormalidades en la disposición de los ojos. G-Ausencia de queratodontes.

El análisis cuantitativo de las anomalías permitió determinar toxicidad en una de las muestras evaluadas correspondientes a la problemática agrícola. En donde la presencia de individuos con intestinos desplazados resultó ser significativamente mayor ($p < 0,05$) a las registradas para el sitio de referencia. El resto de las anomalías no resultaron ser significativas para ninguna de las muestras evaluadas.

Si bien en este ensayo la mayoría de las anomalías detectadas no resultaron significativas, y consecuentemente no se pudieron establecer asociaciones con los sitios, se pudieron evidenciar anomalías que no habían ocurrido en los ensayos de EG25, y que presentaron mayor relevancia y severidad, como ser las anomalías en la disposición de los ojos.

La muestra proveniente del sitio 9 de la problemática agrícola provocó la presencia de individuos con intestinos anormales. Como se explicó en el capítulo 2 esta anomalía se clasificó con un grado de severidad grave, ya que el grado de enrollamiento y desplazamiento de los intestinos era tal que permitía inferir que los individuos no podían asimilar el alimento correctamente.

Considerando la totalidad de los puntos finales evaluados, estos permitieron detectar toxicidad en las diferentes muestras evaluadas. Los sedimentos más tóxicos provocaron mortalidades del 100% de los individuos a los pocos días de exposición. En algunas de las muestras en las que la mortalidad no fue significativa, se logró evidenciar toxicidad a nivel de efectos subletales como inhibición del crecimiento, y presencia de anomalías, mostrando la utilidad del empleo de estos puntos finales.

Bioensayos con embriones de *Rhinella arenarum* EG8

Los resultados obtenidos de la evaluación del punto final mortalidad, indicaron presencia de toxicidad en el 20% de las muestras analizadas, presentando mortalidades significativamente mayores ($p < 0,05$) en dos muestras provenientes de la problemática industrial

En la figura 3.10 se presentan los resultados para los sitios que presentaron mortalidades significativas.

Los resultados permiten distinguir que el mayor porcentaje de mortalidad (100% de los individuos) se observó en la muestra del sitio 14 de la problemática industrial, detectando efectos significativos a partir del 5to día de exposición. Se observaron además mortalidades del 70% de individuos en la muestra del sitio 16 de la problemática industrial a partir del 4to día de exposición.

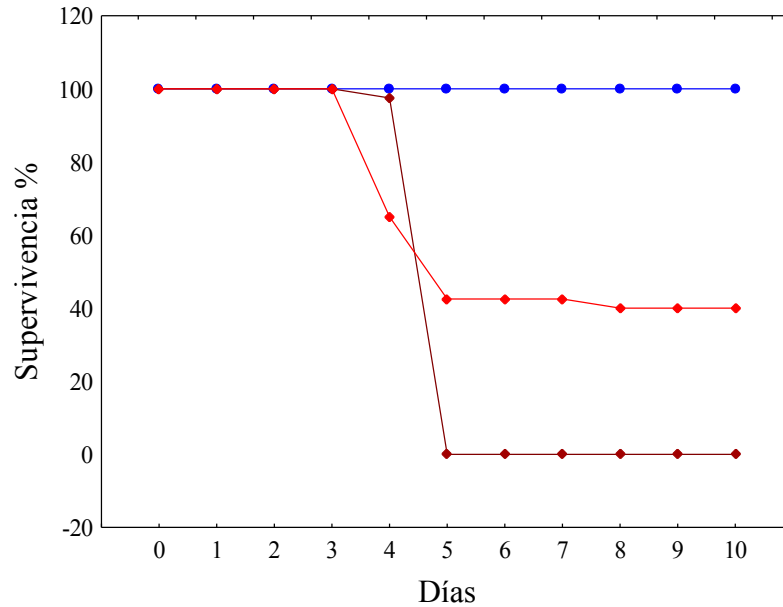


Figura 3.10-Curvas de supervivencia para los individuos expuestos al sitio de referencia (línea azul) y sitios 14 (Línea roja) y 16 (Línea negro) de la problemática industrial, correspondientes al ensayo con *R. arenarum* en estadio 8 EG.

Los resultados de la evaluación de los diferentes puntos finales subletales, permitieron evidenciar toxicidad en todas las muestras de sedimentos evaluadas.

Al evaluar el crecimiento y desarrollo de los individuos se evidenció, una marcada inhibición del crecimiento y del desarrollo en todos los sitios evaluados ($p < 0,05$).

Los resultados no permitieron detectar efectos significativos en la actividad natatoria de los individuos expuestos a los sitios evaluados respecto al sitio de referencia (S3).

El análisis de la presencia de anomalías morfológicas, permitió observar un total de 4 tipos de anomalías a saber (Figura 3.11): Flexión de la cola, Ausencia de queratodontes, Edemas e Intestino desplazado. Estas anomalías fueron detectadas en el 34,5% de los individuos observados (N total = 1011).

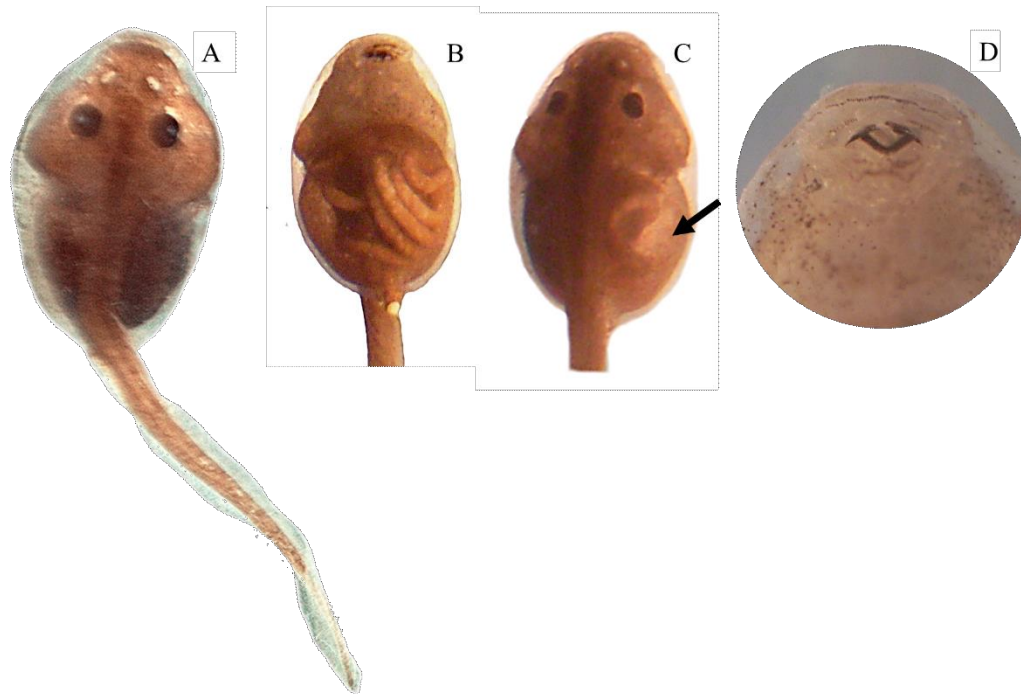


Figura 3.11 Anormalidades registradas para *R. arenarum* en estadio 8 (EG). A- Flexión de la cola, B- Intestino desplazado, C- Edema, D- Ausencia de queratodontes.

El análisis cuantitativo de las anormalidades permitió determinar toxicidad en 6 de las muestras evaluadas. De las cuales 4 muestras corresponden a la problemática agrícola, 1 muestra a la problemática urbana y 1 muestra a la problemática industrial.

Entre las anormalidades encontradas, las más frecuentes fueron la presencia de individuos con flexiones en la cola y ausencia de queratodontes.

Las muestras de la problemática urbana fueron las que presentaron un mayor número de anormalidades siendo estas: flexión de la cola, edemas e intestinos desplazados, todas ellas fueron significativamente mayores en los individuos expuestos a sedimentos del sitio 11. Como se explicó en el capítulo 2 las anormalidades aquí detectadas, ponen en peligro la supervivencia de los individuos tanto de forma directa, por ejemplo, impidiendo la alimentación adecuada (intestinos desplazados) como indirectamente al provocar alteraciones que dejan a los individuos más propensos a ser presas para los depredadores (flexión de la cola). En este caso las anormalidades del intestino se determinaron de severidad alta, debido al grado de desplazamiento y enrollamiento del intestino. Por otro lado, las muestras de la problemática agrícola e industrial provocaron en los individuos flexiones de la cola y ausencia de queratodontes, estas anormalidades fueron clasificadas de baja severidad ya que los individuos podían alimentarse normalmente y no presentaban un riesgo para la metamorfosis.

Considerando los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la totalidad de los puntos finales, podemos concluir que estos permitieron determinar toxicidad en una gran diversidad de muestras evaluadas. Los sedimentos más tóxicos provocaron mortalidades elevadas a los pocos días de exposición, y en los casos en que la mortalidad no fue significativa se pudieron observar efectos subletales como inhibición del crecimiento y en algunos casos se observaron altas ocurrencias de anomalías, de diferente tipo y severidad, los que permitieron determinar y clasificar la toxicidad y peligrosidad de las muestras evaluadas.

Comparación de la sensibilidad de las especies de estudio.

Con la intención de comparar la sensibilidad de ambas especies de estudio se comparó la respuesta de los puntos finales que resultaron significativos en las dos etapas del desarrollo evaluadas EG8 y EG25 para ambas especies: mortalidad e inhibición de crecimiento.

Los porcentajes de mortalidad que presentaron las larvas al ser expuestas a las diferentes problemáticas ambientales resultaron significativamente diferentes entre las especies. La especie *B. pulchella* presentó porcentajes de mortalidad mayores a los observados para *R. arenarum* al ser expuesta desde la etapa embrionaria EG8. En el caso de la exposición desde EG25 no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad entre las especies, pero las larvas de que *B. pulchella* permitieron detectar toxicidad en un mayor número de muestras de sedimento, lo que denota una mayor sensibilidad de esta especie, o al menos que la herramienta propuesta empleando esta especie resulta más sensible.

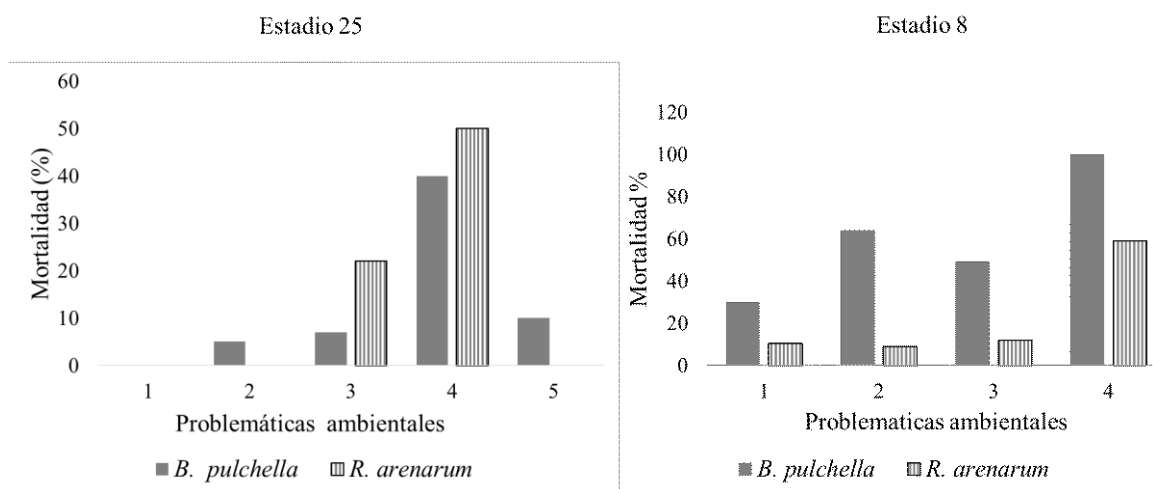


Figura 3.12 -Comparación de la sensibilidad de *R. arenarum* (caja rayada) y *Boana pulchella* (caja gris) considerando el porcentaje de mortalidad para cada una de las problemáticas ambientales. 1- referencia, 2- agrícola, 3- urbana, 4- industrial, 5- descargas cloacales.

La comparación de los resultados obtenidos al evaluar efectos subletales, permitieron evidenciar la existencia de diferencias significativas en la sensibilidad de ambas especies. La que se manifestó no solo al evaluar la magnitud en la respuesta por exposición a una muestra

toxica determinada, sino en la sensibilidad de respuesta diferencial ante la exposición a sedimentos provenientes de diferentes sitios y problemáticas (con características muy diferentes).

Por ejemplo, al evaluar la inhibición del crecimiento, las larvas de *B. pulchella* en estadio 25 evidenciaron efectos en un mayor número de muestras de la problemática agrícola y urbana mientras que *R. arenarum* evidenció efectos en un mayor número de muestras de la problemática industrial y descargas cloacales (Figura 3.13).

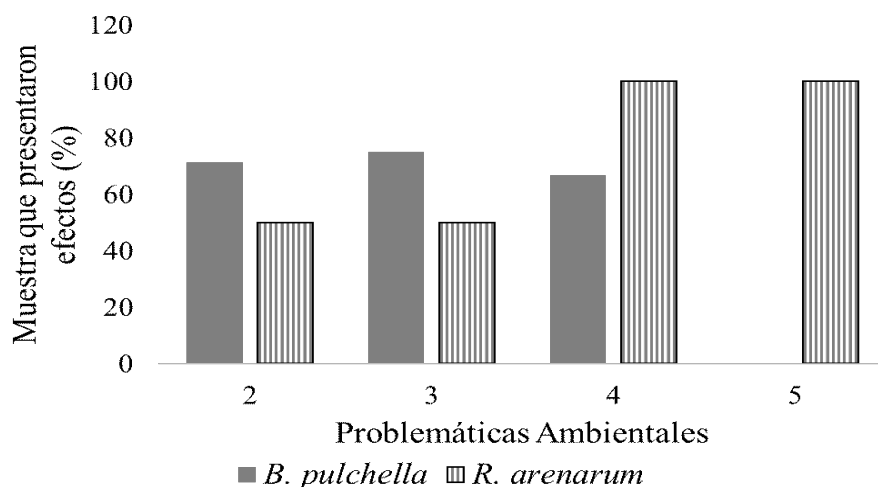


Figura 3.13 -Comparación de la sensibilidad de *R. arenarum* (caja rayada) y *Boana pulchella* (caja gris) considerando el porcentaje de muestras que presentaron efecto (Inhibición del crecimiento) para cada una de las problemáticas ambientales. 1-referencia, 2- agrícola, 3- urbana, 4- industrial, 5- descargas cloacales.

En cuanto a la comparación de los resultados obtenidos de los bioensayos de toxicidad exponiendo embriones, no se pudo realizar comparaciones a partir de efectos subletales, debido a la mortalidad elevada de larvas de *B. pulchella*.

Estos resultados permiten concluir que la especie *B. pulchella* es más sensible que *R. arenarum*, en las primeras etapas de su ciclo de vida acuático tanto en EG8 como en EG25.

3.3.4 Evaluación de la sensibilidad en diferentes etapas del desarrollo

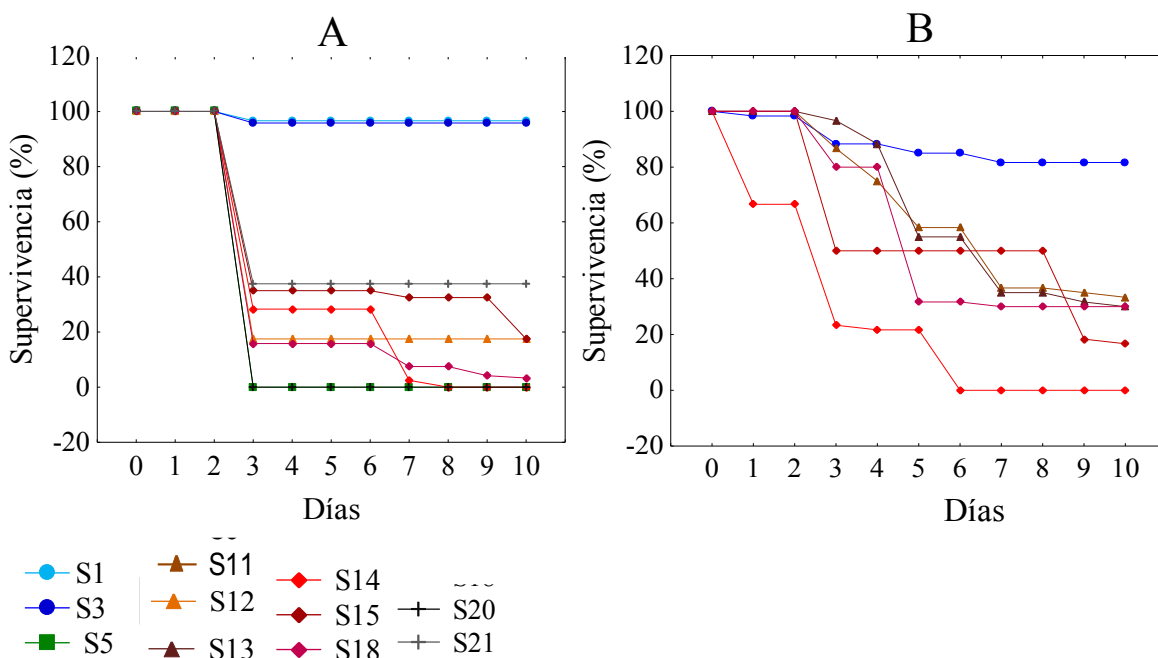
La utilización de larvas pertenecientes a mismas cohortes, seleccionando tres etapas diferentes del desarrollo a lo largo del ciclo larval (EG8, EG25, EG 30), para ambas especies como una variante propuesta para el protocolo, resultó satisfactoria, permitió obtener información relevante y realizar comparaciones de la respuesta válida sobre la variación de la sensibilidad de los individuos en diferentes etapas de su desarrollo.

Sensibilidad de larvas de *Boana pulchella* ciclo completo

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar efectos tóxicos significativos de los sedimentos, con un patrón de respuesta específico en cada etapa del desarrollo, e interpretar la variación de la sensibilidad de individuos pertenecientes a mismas cohortes a lo largo del ciclo de vida larval.

En cuanto a los efectos letales, los embriones EG 8 resultaron ser más sensible. mostrando efectos en el 41,1% de las muestras analizadas. La mortalidad fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en 1 muestra de la problemática agrícola, 1 muestra de la problemática urbana, 3 muestras de la problemática industrial y 1 muestra de la problemática de descargas cloacales. Para las larvas EG 25 los efectos letales fueron evidenciados en el 35,29% de las muestras evaluadas, 2 de las cuales corresponden a la problemática urbana, 3 la industrial y 1 muestra a la problemática de descargas cloacales. En cuanto a las larvas EG30 los efectos letales fueron evidenciados en el 35.29% de las muestras evaluadas, correspondientes a la totalidad de las muestras evaluadas de la problemática industrial.

En la Figura 3.14 se pueden observar las curvas de supervivencia de los individuos expuestos a estos sedimentos, para cada estadio.



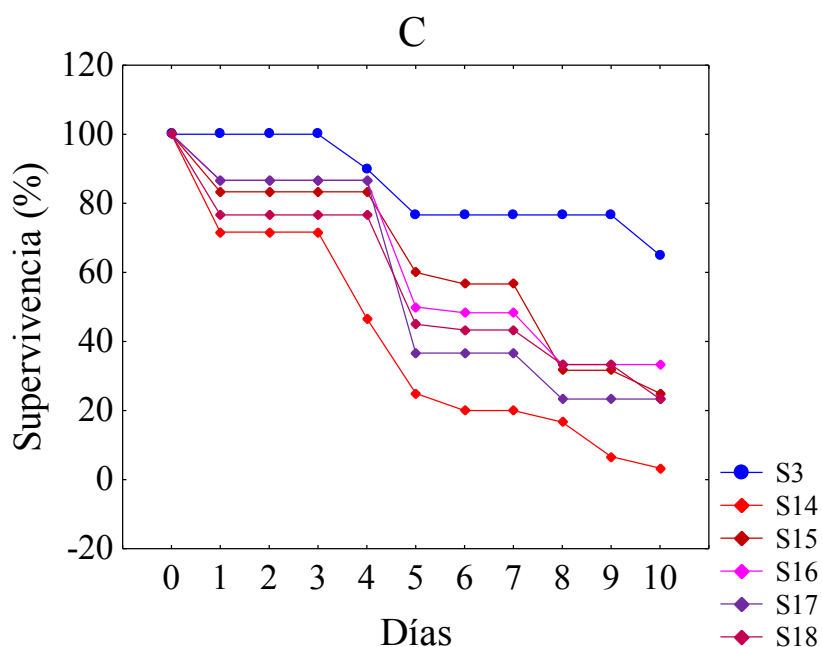


Figura 3.14 Curvas de supervivencia de los individuos expuestos al sitio de referencia y a los sitios que presentaron mortalidades significativas en el ensayo con *B. pulchella*. A- Estadio 8. B- Estadio 25- C- Estadio 30.

Los diferentes puntos finales subletales evaluados permitieron evidenciar toxicidad en las muestras de sedimentos de las problemáticas evaluadas.

Los embriones en estadio EG8 y las larvas EG25 no presentaron diferencias significativas en cuanto a las tasas de crecimiento, sin embargo, las larvas en estadio 30 presentaron inhibición significativa del crecimiento como resultado de la exposición a sedimentos provenientes de 2 sitios (16 y 18) afectados por la problemática industrial.

Con respecto a los efectos sobre las tasas de desarrollo y la actividad natatoria no se evidenciaron diferencias significativas entre las muestras y el sedimento del sitio de referencia para ninguna de las etapas evaluadas.

El análisis de la presencia de anomalías morfológicas permitió detectar un total de 5 tipos de anomalías (Figura 3.13) a saber: Flexión de la cola, hipopigmentación, intestinos desplazados, ausencia de queratodontes y edemas.

El mayor porcentaje de individuos anormales registrados fue para las larvas EG25 (13,36 %, N = 666), seguida de presentada por los embriones EG8 (9,08 %, N = 826) y por último las larvas EG30 (5,25 %, N = 552)

El análisis cuantitativo de las anomalías permitió determinar toxicidad en 4 de las muestras evaluadas con larvas en EG8, de las cuales una muestra corresponde a la problemática urbana y las otras 3 a la problemática industrial. Por otro lado, las larvas

expuestas a partir de EG25 permitieron detectar toxicidad en 2 muestras correspondientes a la problemática agrícola e industrial, mientras que las larvas expuestas desde EG30 permitieron detectar toxicidad en 2 muestras de la problemática industrial.

Entre las anomalías encontradas, las más frecuentes fueron la ausencia de queratodotes y los intestinos desplazados.

Las muestras de las problemáticas industrial fueron las que provocaron un mayor número de anomalías siendo estas: la ausencia de queratodotes e intestinos desplazados, las cuales fueron observadas en larvas expuestas en todos los estadios. Como se explicó en el capítulo 2 estas anomalías constituyen un riesgo para la supervivencia de los individuos, independientemente del estadio en que se manifiesten. La ausencia de queratodotes se clasificó como una anomalía de severidad media ya que los individuos no pueden alimentarse normalmente. Por otro lado, la presencia de individuos con intestinos desplazados se clasificó con una severidad alta debido al grado de desplazamiento del intestino. Por otro lado, las muestras de la problemática agrícola y urbana provocaron un aumento significativo en el número de individuos con hipopigmentación (al ser expuestos desde EG25) e intestinos desplazados al ser expuestos desde EG8.

En la Figura 3.15 se muestran las anomalías que fueron significativas en cada estadio y problemática.

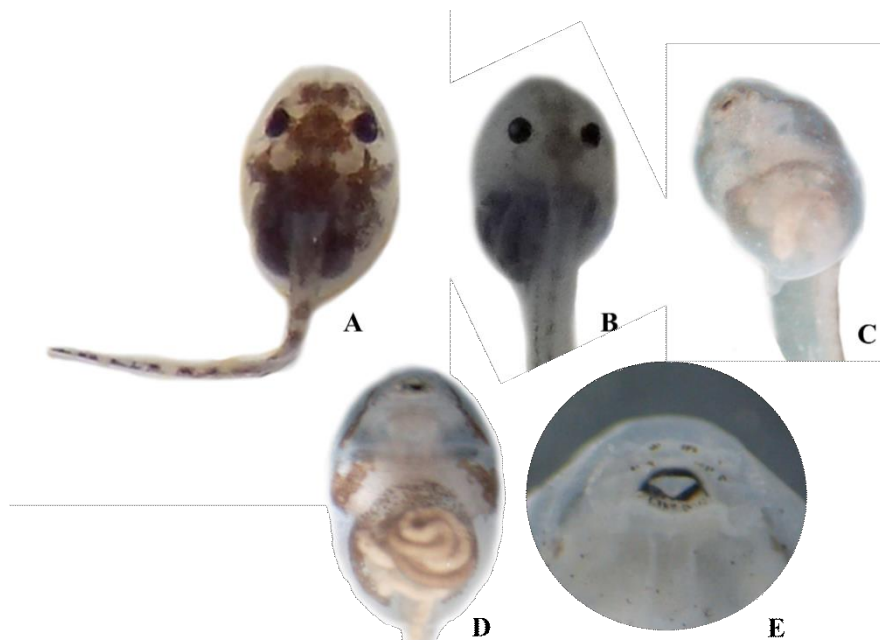


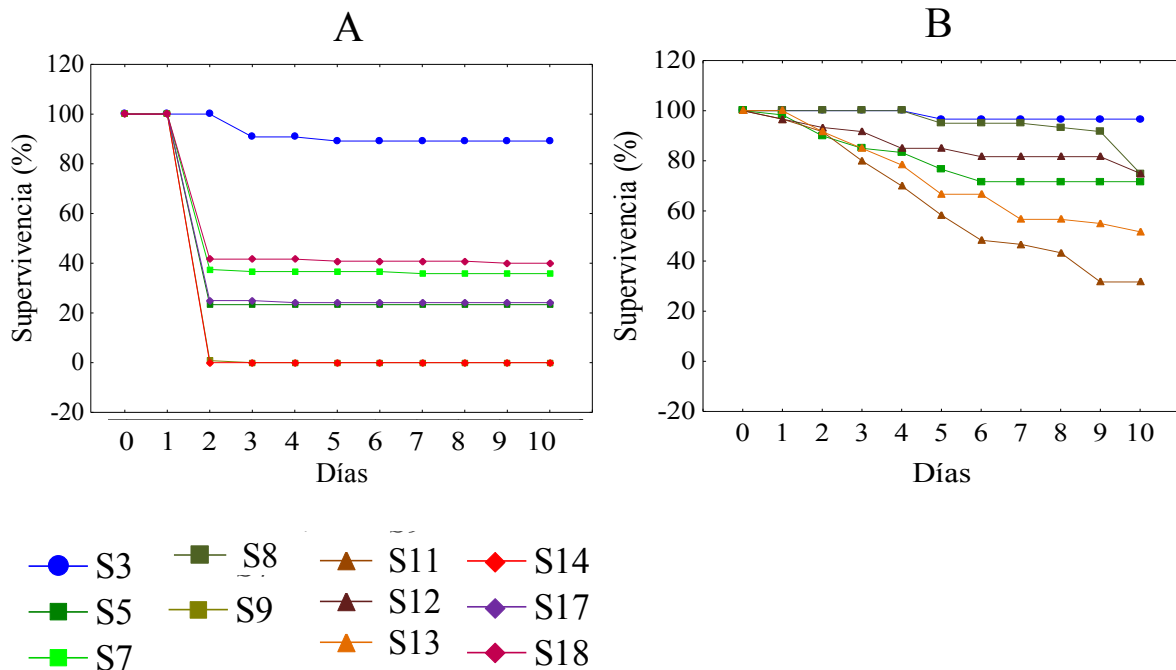
Figura 3.15. Anomalías registradas para individuos de *B. pulchella* en ensayos con tres estadios de desarrollo. A- Flexión de la cola, B-Hipopigmentación; C-Edema; D-Intestino desplazado; E-Ausencia de queratodotes.

Sensibilidad de larvas de *Rhinella arenarum* ciclo completo

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar toxicidad provocada por exposición a sedimentos provenientes de los sitios evaluados, y asociar patrones de respuesta específicos en las distintas etapas del desarrollo.

La comparación de los resultados obtenidos del análisis de efectos letales, permitieron distinguir que las larvas EG25 resultaron ser más sensibles. mostrando efectos significativos para el 69% de las muestras analizadas. La mortalidad fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en las larvas expuestas a 2 muestras de la problemática agrícola, 3 muestras de la problemática urbana y en la totalidad de las muestras de la problemática industrial (6), respecto de las larvas expuestas a sedimentos de los sitios de referencia. Los efectos letales en los embriones EG8 fueron evidenciados en el 37% de las muestras evaluadas, 3 de las cuales corresponden a la problemática agrícola y 3 la industrial. En cuanto a las larvas EG30 mostraron efectos letales en el 45% de las muestras evaluadas, una correspondiente a la problemática agrícola y el resto correspondiente a muestras provenientes de la problemática industrial.

En la figura 3.16 se pueden observar las curvas de supervivencia de los individuos expuestos a estos sedimentos, para cada estadio.



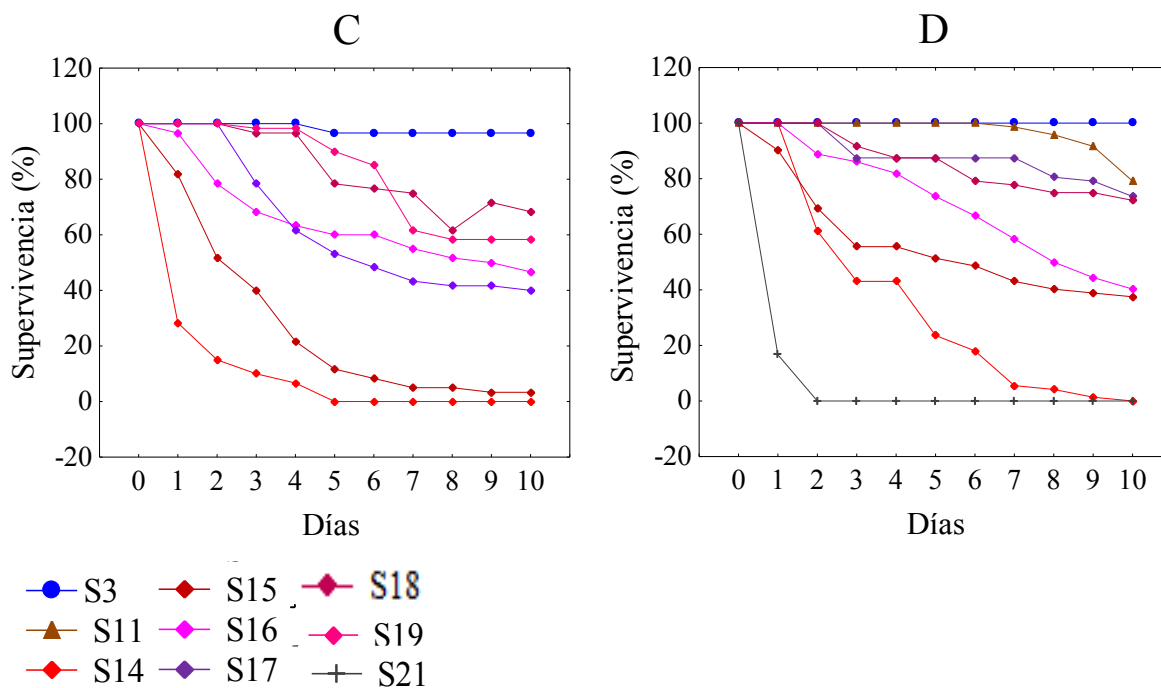


Figura 3.16-Curvas de supervivencia de los individuos expuestos al sitio de referencia y a los sitios que presentaron mortalidades significativas en los ensayos con *R. arenarum* en diferentes estadios A- Estadio EG8, B- Estadio EG25 correspondientes a los sitios de las problemáticas Agrícolas y Urbanas, C- Estadio EG25 correspondientes a los sitios de la problemática Industrial. D- Estadio EG30.

Los diferentes puntos finales subletales evaluados permitieron evidenciar toxicidad en las muestras de sedimentos de las problemáticas evaluadas.

Los embriones en estadio EG8 presentaron inhibición significativa del crecimiento al ser expuestos a 1 muestra de la problemática industrial y crecimiento significativamente mayor en individuos de tres tratamientos de la problemática agrícola y urbana. Por otro lado, las larvas en estadio EG30 mostraron inhibición significativa del desarrollo al ser expuestas a 7 de las muestras evaluadas, las cuales se corresponden con las problemáticas urbana (2 muestras) e industrial (5 muestras). Las larvas en estadio EG25 no presentaron diferencias significativas en el crecimiento.

Con respecto a las alteraciones en las tasas de desarrollo, se pudo evidenciar inhibición significativa del desarrollo en individuos expuestos desde EG8 a 3 de las muestras evaluadas correspondientes a las problemáticas agrícola, urbana e industrial. Además, las larvas expuestas desde el estadio EG30 mostraron inhibición del desarrollo en individuos expuestos a 3 muestras correspondientes a las problemáticas agrícola (2 muestras) y urbana (1 muestra). No se evidenciaron diferencias significativas en el desarrollo de las larvas expuestas en estadio 25 EG.

El análisis de la presencia de anomalías morfológicas permitió observar un total de 8 tipos de anomalías a saber: Flexión de la cola, cuerpo asimétrico, cuerpo cóncavos hipopigmentación, intestino desplazado, ausencia de queratodotes, edema y ausencia de pico córneo.

El mayor porcentaje de individuos anormales registrados fue para las larvas expuestas a partir de estadio EG30 (30,93 %, N = 944), seguido por embriones expuestos a partir de EG8 (11, 44 %, N = 1224) y por último las larvas expuestas en estadio 25 EG (8, 13 %, N = 627).

El análisis cuantitativo de las anomalías permitió determinar toxicidad en 3 de las muestras evaluadas con larvas en estadio EG8 y EG30. De las cuales una muestra corresponde con la problemática agrícola y las otras dos con la problemática industrial. Por otro lado, las larvas expuestas en estadio 25 permitieron detectar toxicidad en una muestra de la problemática urbana.

Entre las anomalías encontradas, las más frecuentes fueron la presencia de individuos con flexiones en la cola, ausencia de queratodotes e intestinos desplazados.

Las muestras de la problemática industrial fueron las que presentaron un mayor número de anomalías siendo estas: ausencia de queratodotes y pico córneo, edemas e intestinos desplazados, las cuales fueron observadas en larvas expuestas desde estadios EG8 y EG30 .

Tal como se explicó en el capítulo 2 la presencia de estas anomalías pone en peligro la supervivencia de los individuos afectados. La ausencia de queratodotes se clasificó como una anomalía de severidad baja, pero asociada a la ausencia de pico córneo resulta en una alteración más severa, ya que los individuos no pueden alimentarse normalmente. Por otro lado, la presencia de individuos con intestino desplazado se clasificó como una anomalía de severidad alta vinculada con el grado de desplazamiento del intestino. Por otro lado, las muestras de la problemática urbana provocaron una frecuencia de ocurrencia significativamente mayor de individuos con intestinos desplazados (al ser expuestos desde estadio EG8 y EG25), un mayor número en la ocurrencia de edemas en individuos expuestos a partir del estadio EG30. La primera de estas anomalías fue clasificada como severa ya que el grado de enrollamiento y desplazamiento de los intestinos era tal que los individuos no podían asimilar el alimento correctamente. Mientras que la presencia de edemas se clasificó como de severidad baja debido a que los individuos podían desplazarse normalmente. Por último, la muestra proveniente de sitios afectados por la problemática agrícola provocó en los individuos la presencia de edemas considerados de baja severidad.

En la Figura 3.17 se muestran los porcentajes de ocurrencia de las anomalías encontradas en cada estadio, y que resultaron significativos, en asociación con cada una de las problemáticas. En dicha figura se puede observar que el mayor porcentaje de anomalías se registró en los individuos expuestos desde huevo EG8, luego en los individuos expuestos desde EG30 y, por último, las larvas expuestas desde EG25.







Zonas de estudio	SDT 8	SDT 25	SDT 30
Agrícola	 <p>Edema 2,5 %</p>		
Urbana	 <p>Intestino desplazado 9,4 %</p>	 <p>Intestino desplazado 23,02 %</p>	 <p>Edema 8,88%</p>
Polo petroquímico	 <p>Falta de queratodontes 7,88 %</p>		 <p>Intestino desplazado 21,47 %</p>

Figura 3.17 Porcentaje de la frecuencia de anomalías detectadas en cada estadio de desarrollo (STD 8, 25, 30) según la problemática de estudio.

En la Figura 3.18 se presentan los resultados de los puntos finales evaluados para los diferentes estadios, en donde se puede apreciar que la mortalidad, en los tres estadios fue mayor en los individuos expuestos a sedimentos de la petroquímica y la inhibición del crecimiento y del desarrollo se evidenció más en las larvas expuestas a partir del estadio 30.

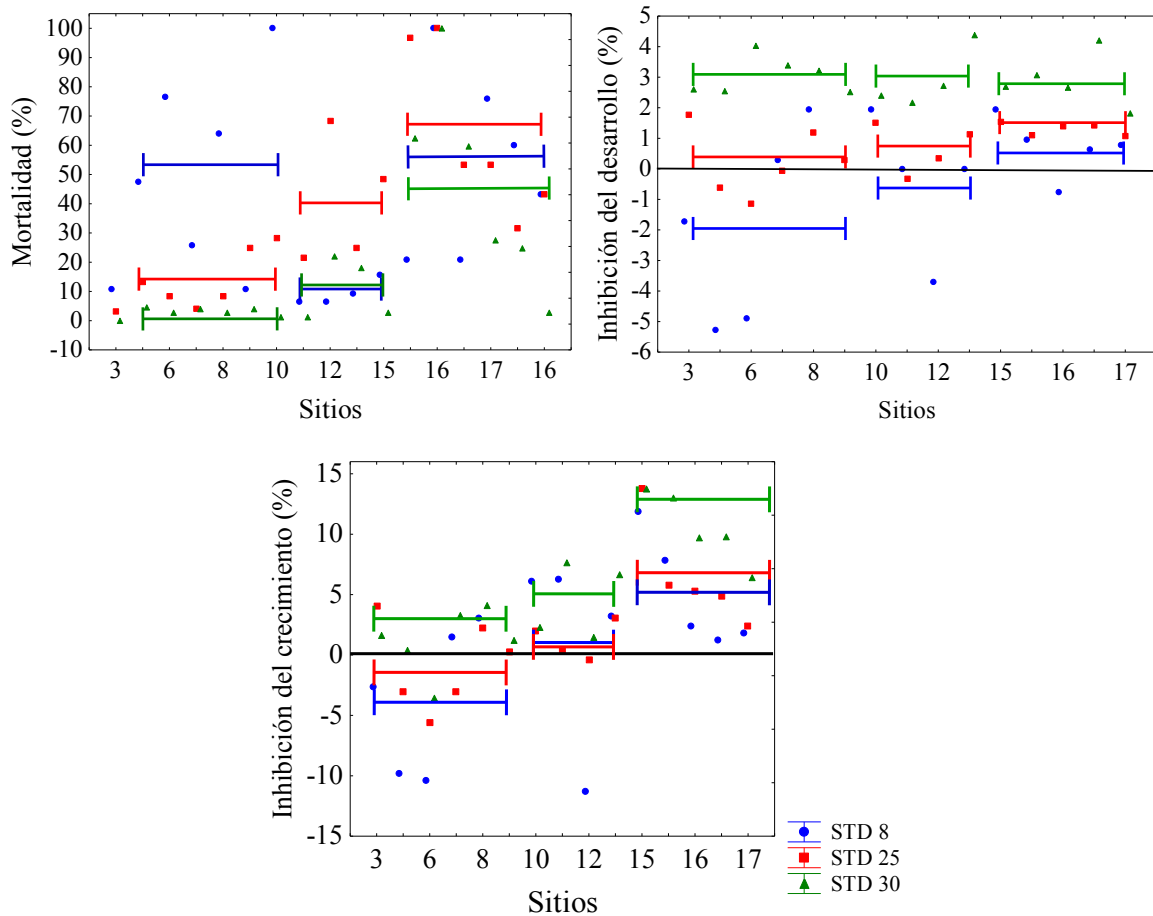


Figura. 3.18. Gráficos de los puntos finales evaluados. Porcentaje de mortalidad, inhibición del crecimiento porcentual e inhibición del desarrollo porcentual para los diferentes estadios (EG8; EG25; EG30) por sitio. Las líneas representan el promedio de cada variable por problemática de estudio.

Los resultados de porcentajes de mortalidad que presentaron las larvas al ser expuestas en diferentes estadios resultaron significativamente diferentes ($p < 0,05$). La especie *Bona pulchella* presento porcentajes de mortalidad mayores al ser expuesta desde estadio 8 (EG). En el caso *R. arenarum* se observaron mortalidades mayores al ser expuestas desde estadio 8 y 25 (EG) (Figura 3.19).

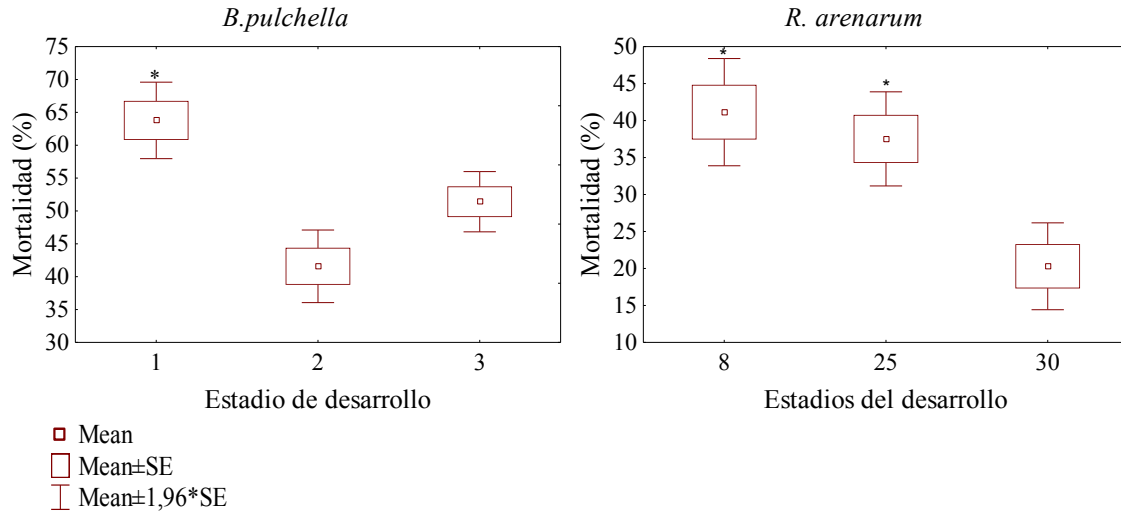


Figura 3.19 -Comparación de la sensibilidad de los diferentes estadios de exposición considerando el porcentaje de mortalidad. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a los efectos subletales, se evidenciaron diferencias significativas en la respuesta de los diferentes estadios de exposición.

Al evaluar la inhibición del crecimiento, para ambas especies las larvas expuestas en estadio 30 (EG) detectaron toxicidad en un número mayor de muestras evaluadas. Por otro lado, la presencia de anomalías resultó ser significativamente mayor en individuos expuestos desde estadio 8 (EG) para ambas especies.

Este resultado aporta evidencias en favor de la utilidad de emplear la variante propuesta para el protocolo EG25 exponiendo embriones EG8, al momento de evaluar expresión de anomalías, y efectos relevantes en el desarrollo, de tipo teratogénicos.

Comparación de la sensibilidad entre especies considerando diferentes etapas del ciclo larval

Con la intención de comprar la sensibilidad entre las especies se seleccionaron tres muestras de sedimento para las que se evidenció toxicidad en ambas especies, evaluando los puntos finales mortalidad, crecimiento y desarrollo.

Al interpretar los resultados de mortalidad en ambas especies a lo largo del ciclo de vida acuático, se puede apreciar que la especie *B. pulchella* posee mayor sensibilidad que *R. arenarum*. La mayor diferencia se da en la que determinamos anteriormente como la etapa más sensible del ciclo EG8 en la que *B. pulchella* alcanza tasas de mortalidad del 70% mientras que *R. arenarum* no alcanza el 50%. Esta misma magnitud en la diferencia se presenta en las larvas expuestas a partir de EG30, mientras que en el estadio EG25 no se detectan diferencias significativas entre la sensibilidad de ambas especies, respecto al punto final mortalidad.

Al comparar los puntos finales subletales, se puede apreciar que la especie *R. arenarum* resulto más sensible para evaluar estos puntos finales. La mayor diferencia se da en el EG 8 en el que *R. arenarum* presenta inhibición significativa del crecimiento y del desarrollo y mayor tipo de anormalidades, mientras que *B.pulchella* no presenta inhibiciones en el crecimiento ni el desarrollo y tiene un menor número de anormalidades. Por otro lado, en el EG 30 también se observaron diferencias entre las especies, al comparar la respuesta en el desarrollo, la especie *R. arenarum* presenta inhibiciones en el desarrollo mientras que para *B. pulchella* no se observaron diferencias. Para el EG 25 no se detectan diferencias significativas entre la sensibilidad de ambas especies, respecto a los puntos finales subletales.

3.3.5 Bioensayo crónico con *Rhinella arenarum* (desde huevo hasta la metamorfosis)

Los resultados obtenidos a partir de la realización del ensayo crónico, como una variante propuesta para el protocolo, resultó satisfactoria, la especie resultó ser adecuada llegando exitosamente a la metamorfosis. Los resultados fueron consistentes con la información obtenida de los anteriores bioensayos, aportando información valiosa que permite realizar inferencias y estimaciones más confiables sobre los efectos que los estresores ambientales (en este caso contaminación de origen múltiple) pueden provocar sobre la biología de la especie, durante el ciclo larval. La realización de este tipo de experimento permite generar información complementaria a los bioensayos agudos, y de mayor realismo sobre las consecuencias e implicancias de la exposición sostenida a sedimentos contaminados.

El tiempo requerido para que la totalidad de los individuos alcanzara la metamorfosis fue de 102 días con un rango de 51 días entre el primer y el último individuo que alcanzaron la metamorfosis.

Los resultados obtenidos para el punto final mortalidad indicaron efectos en el 40% de las muestras analizadas. A partir del día 12 de exposición se comenzaron a evidenciar efectos significativos en la mortalidad de los individuos expuestos a tratamientos de la problemática Industrial y de descarga cloacales y a partir del día 72 se evidenciaron mortalidades significativamente mayores en los individuos expuestos a los sedimentos de la problemática agrícola e industrial.

En la figura 3.20 se puede observar las curvas de supervivencia de los individuos expuestos a las muestras de sedimentos que mostraron efectos significativos en la mortalidad.

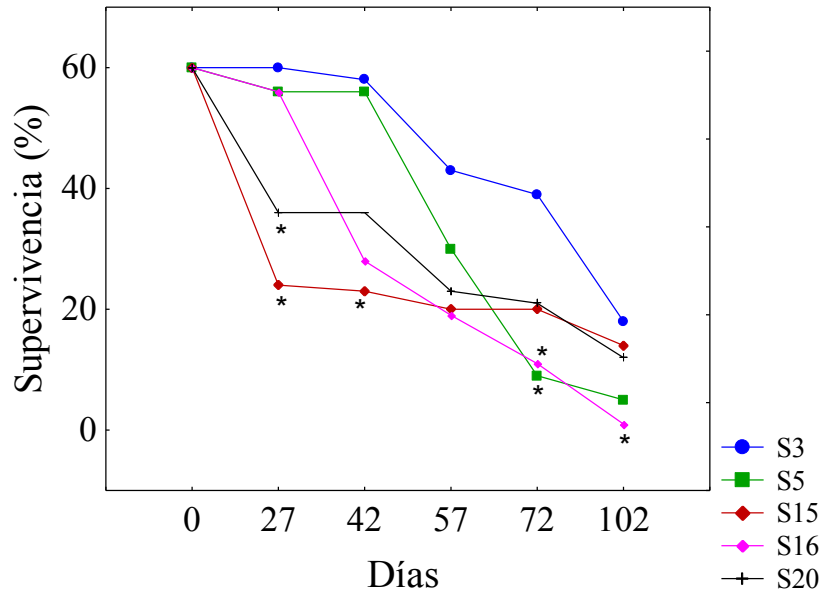


Figura 3.20 Curvas de supervivencia de los individuos expuestos al sitio de referencia y a los sitios que presentaron mortalidades significativas en el ensayo crónico con *R. arenarum*. Con asteriscos se indican los tiempos en los cuales se detectaron diferencias significativas mortalidad $P < 0,05$ entre los sitios.

Los diferentes puntos finales subletales evaluados permitieron evidenciar toxicidad para 5 muestras de sedimentos provenientes de las problemáticas agrícola, urbana e industrial.

El resultado de la evaluación de las tasas de crecimiento de los individuos permitió determinar la toxicidad de determinados sedimentos los cuales provocaron variaciones en el crecimiento de las larvas a lo largo del tiempo. Tal como puede observarse en la figura 3.21 a partir del día 27 de exposición se evidenció un crecimiento significativamente mayor en los individuos expuestos a las muestras de la problemática agrícola (sitios 5 y 9) y de descargas cloacales (20 y 21). Para el día 42 se pudo detectar la inhibición del crecimiento en las larvas expuestas a muestras de la problemática industrial (16). Para el día 57 los individuos expuestos a la muestra del sitio 9 de la problemática agrícola presentaron un aumento significativo en la tasa de crecimiento. En el día 87 se observó que las larvas expuestas a sedimentos provenientes de la problemática agrícola (5) presentaban inhibición significativa del crecimiento.

Por otro lado, las evaluaciones de las tasas de desarrollo permitieron detectar toxicidad en tres de las muestras evaluadas. Los individuos expuestos a sedimentos de la problemática urbana (S12) e industrial (S16,18) presentaron tasas de desarrollo significativamente menores y mayores tiempos de metamorfosis que los individuos del grupo control. Por otro lado, los individuos expuestos a sedimentos afectados por descargas cloacales y agrícolas (S9) presentaron tasas de desarrollo significativamente mayores alcanzando la metamorfosis

en menor tiempo. En la Figura 3.21B se muestran los estadios de desarrollo de los individuos alcanzados en los diferentes sitios a lo largo del tiempo.

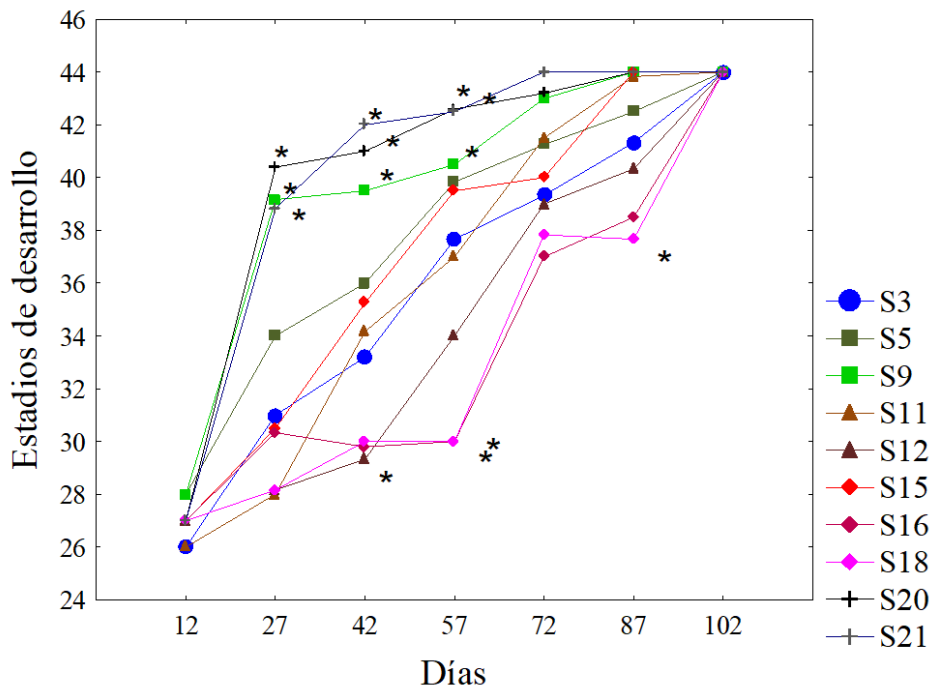
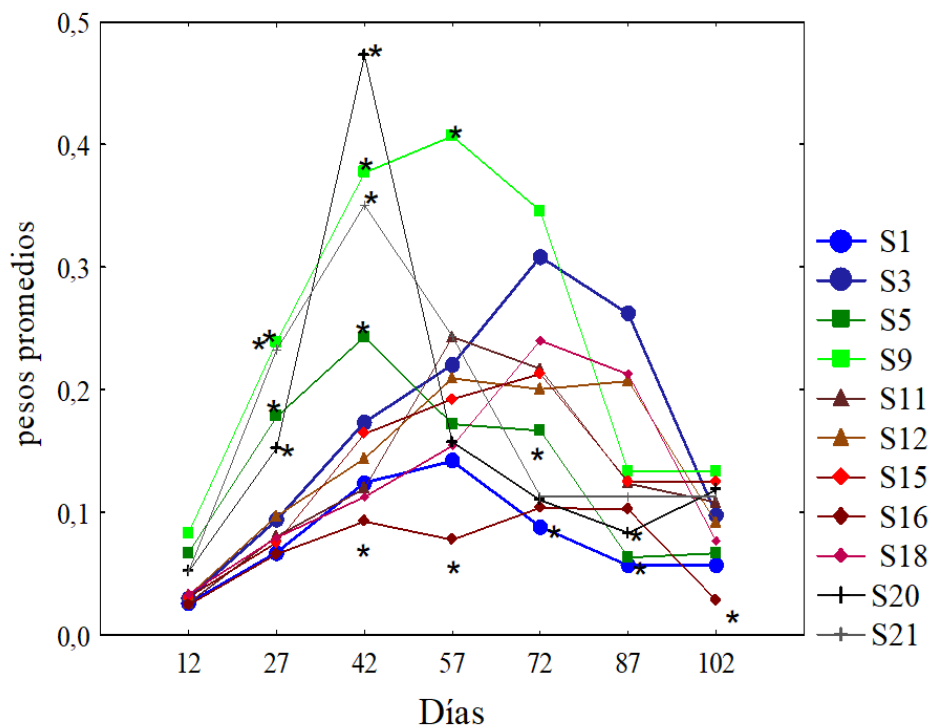


Figura 3.21 A- Grafico de los pesos de los individuos alcanzados en los diferentes sitios a lo largo del tiempo. B- Grafico de los estadios de desarrollo de los individuos alcanzados en los diferentes sitios a lo largo del tiempo.

El tiempo para alcanzar el clímax metamórfico (EG42) y el tiempo para completar la metamorfosis (EG46) fueron diferentes para dos de las muestras. Las larvas expuestas a las muestras del sitio 21 de la problemática afectada por las descargas cloacales completaron la metamorfosis a tiempos significativamente menores (39 días) respecto de las larvas del sitio referencia, mientras que las larvas expuestas a sedimentos provenientes del sitio 16 afectados por la problemática industrial tardaron significativamente más en completar la metamorfosis (100 días). Para el resto de las muestras, incluidos los sitios de referencia, los renacuajos completaron su metamorfosis en un periodo comprendido entre 56 y 72 días de exposición.

El análisis de la presencia de anomalías morfológicas, permitió observar un total de dos tipos de anomalías (Figura 3.22) a saber: Flexión de la cola y Edema.

El análisis cuantitativo de las anomalías no permitió determinar toxicidad en las muestras ya que la frecuencia de ocurrencia no presentó diferencias significativas para ninguna de las muestras evaluadas.

Aun así, se puede destacar que la presencia de individuos con edemas se presentó en la muestra del sitio 16 de la problemática industrial, estos individuos solo sobrevivieron 3 días luego de detectada la anomalía por lo que la misma fue clasificada como de alta severidad. Por otro lado, los individuos que presentaron flexiones en las colas llegaron al clímax metamórfico y lograron la metamorfosis, algunos de ellos presentaron, luego de la metamorfosis escoliosis de la columna a la altura del urostilo, sin embargo, esta curvatura de la columna les permitía desplazarse sin inconvenientes.

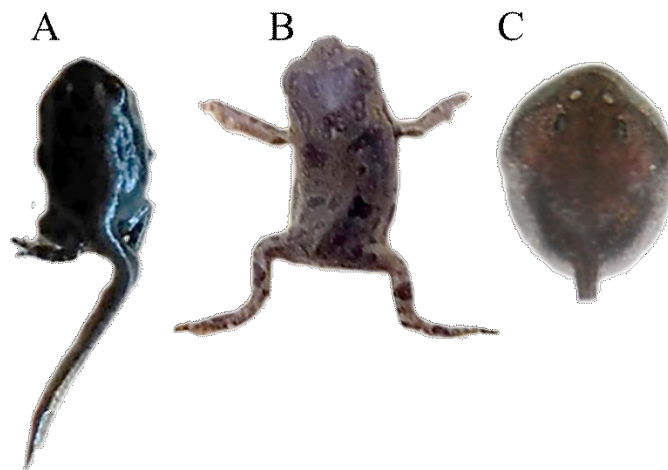


Figura 3. 22 Anormalidades registradas para *R. arenarum* en el ensayo crónico. A- Flexión de la cola en larva de estadio 42 EG, B-Desvió de la columna, C- Edema general.

3.3.6 Bioensayo utilizando diluciones de sedimento

Con el objetivo de ampliar la precisión de la información generada en base a los datos de toxicidad relativa de las muestras de sedimento que provocaron mortalidades del 100% de los individuos expuestos, se realizaron 2 bioensayos empleando diluciones de los sedimentos del sitio 21 (descargas cloacales) y del sitio 14 (problemática industrial) con *R. arenarum*.

Los resultados obtenidos de la evaluación del punto final mortalidad evidenciaron toxicidad para las muestras evaluadas. En el caso del ensayo de la problemática de descarga cloacales, no se evidenciaron mortalidades significativas en las diluciones realizadas, pero sí se detectó un aumento significativo de la mortalidad para al sedimento sin diluir a partir del primer día de exposición.

Por otro lado, en las diluciones del sedimento de la problemática industrial se detectó un aumento significativo en la mortalidad en los individuos expuestos a partir de la dilución 50.

En el sedimento sin diluir las mortalidades fueron significativas a partir del primer día de exposición, para las diluciones 75 y 50 siendo estas significativas a partir del cuarto día de exposición, tal como puede apreciarse en la Figura 3.23.

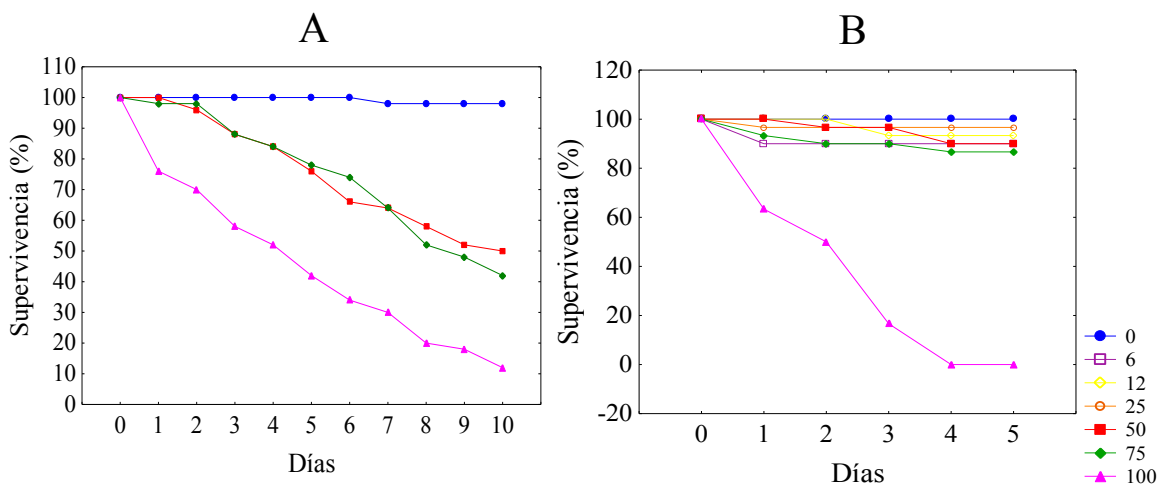


Figura 3.23 Curvas de supervivencia de los individuos expuestos a las diluciones de sedimentos. Grafico A-Sedimentos del sitio 14 de la problemática industrial. Grafico B- Sedimentos del sitio 21 de descargas cloacales

Los resultados de la evaluación de los puntos finales subletales, por exposición a sedimentos provenientes de descargas cloacales evidenció inhibición significativa del crecimiento de los individuos expuestos al sedimento sin diluir. Mientras que para el ensayo de la problemática industrial los individuos, presentaron inhibición significativa del crecimiento y disminución de la tasa de desarrollo al ser expuestos a partir de la dilución 25%.

El análisis de la ocurrencia de anomalías morfológicas, permitió observar un total de 6 tipos de anomalías a saber (Figura 3.24): cuerpo asimétrico y cóncavo ventralmente, ausencia de queratodontes y pico córneo, flexión de la cola e intestino desplazado.



Figura 3.24. Anormalidades registradas para *R. arenarum* en ensayos con diluciones de sedimento. A- Flexión de la cola, B-Cuerpo cóncavo; C-Intestino desplazado; D- Cuerpo asimétrico E-Ausencia de queratodontes. F-Ausencia de Pico córneo.

El análisis cuantitativo de las anomalías permitió determinar toxicidad para la muestra sin diluir proveniente de la problemática de descargas cloacales y a partir de las diluciones 25 % y 75% para las muestras de la problemática industrial

Las diluciones de las muestras provenientes de las problemáticas industrial fueron las que provocaron un mayor número de anomalías siendo estas: la ausencia de queratodontes y pico córneo. Como se explicó en el capítulo 2 estas anomalías fueron clasificadas de severidad leve, pero al presentarse juntas ponen en peligro la supervivencia de los individuos ya que los mismos no podrán alimentarse adecuadamente, con las implicancias que ello tiene. Por otro lado, los individuos expuestos al sedimento sin diluir de la problemática de descargas cloacales mostraron la expresión de la anomalía denominada cuerpos cóncavos, esta anomalía fue clasificada como levemente severa ya que los individuos se desplazaban y alimentaban con normalidad.

3.3.7. Interpretación integral de resultados obtenidos de la aplicación de la herramienta bioanalítica desarrollada y sus variantes

Problemática agrícola: Los sedimentos provenientes de los ecosistemas influenciados por la problemática agrícola, en la mayoría de los ensayos, provocaron bajos porcentajes de mortalidad, los que en su gran mayoría no resultaron significativos. En particular las muestras

provenientes de los sitios 5, 7 y 9 fueron las que presentaron mayor toxicidad, estas indujeron tasas de mortalidades significativas, inhibición del crecimiento y una elevada frecuencia de anormalidades como edemas, aire subcutáneo (cuerpo hinchado) e hipopigmentación. Los sitios 5 y 7, presentan particularidades que explican la elevada toxicidad de sus sedimentos, como se comentó en el capítulo 1, el sitio 5 además de recibir el agua proveniente de zonas con invernaderos recibe el agua del lavado de camiones, maquinaria y productos recién cosechados. Por otro lado, el sitio 7 se ubica en un campo de cultivo intensivo y no presenta vegetación riparia, de manera que recibe directamente la deriva de productos de la fumigación de los cultivos adyacentes. El sitio 9 corresponde a un ecosistema diferente con influencia directa de cultivo intensivo asociado a los invernaderos.

Problemática industrial: Los sedimentos de la problemática industrial, en particular los sitios 14, 15 y 16 provenientes de los canales Este y Oeste de Berisso resultaron ser los más tóxicos, provocando en todos los casos mortalidades del 100% de las larvas de ambas especies en todos los estadios del desarrollo evaluados a partir de los primeros días de exposición. En los casos que no se evidenciaron mortalidades significativas las larvas exhibieron inhibición en el crecimiento y presencia de anormalidades como presencia de edemas, ausencia de queratodotes e intestinos reducidos y desplazados. Tal como se discutió en el capítulo 2 estas anormalidades resultan graves en el normal desarrollo de los individuos llegando en la mayoría de los casos a provocar la muerte de los individuos afectados. Dichos resultados también fueron sustentados por los resultados obtenidos en el ensayo crónico, en donde se observó una mortalidad significativa a partir del día 12 de exposición, una inhibición significativa del crecimiento a partir del día 42 y menor tasa de desarrollo, así como también la presencia de individuos con edemas generales que no lograron sobrevivir. Esta elevada toxicidad de los sedimentos podría ser explicada por la presencia de altas concentraciones de metales pesados e hidrocarburos que se detectan en estos canales (Ver capítulo 1), los cuales rodean a la refinería y han recibido en el pasado derrames de esta industria, además de recibir permanentemente productos de emisión resultantes de la actividad allí desarrollada. A partir de los bioensayos con diluciones se pudo determinar que a partir de la dilución 50/50 (sedimento referencia/sedimento problema) los individuos presentaban mortalidades significativas y a partir de la dilución 75/25 presentaban inhibición significativa del crecimiento. En cuanto a los sedimentos provenientes de los sitios 17 y 18 no provocaron tasas de mortalidad significativas en los primeros ensayos realizados, pero a partir del tercer año de tesis, los sitios se vieron modificados producto de excavaciones y remoción de la tierra, observándose mortalidades significativamente elevadas al exponer a las larvas a estos sedimentos. Por último, el sitio 19 fue el menos tóxico de los sitios considerados dentro de esta problemática. Las larvas expuestas a este sedimento no presentaron mortalidades significativas ni efectos subletales.

Problemática urbana: Los sedimentos de la problemática urbana, provocaron mortalidades significativas entre el 100% y el 60% de los individuos. En particular el sitio 11 provocó mortalidades en ambas especies en EG 8 y EG25, inhibición del crecimiento, alteraciones en el natación y presencia de anomalías como: ausencia de queratodonte y pico córneo, intestino desplazado y flexiones de la cola. Este sitio como se explicó en el capítulo 1 corresponde a la parte baja del arroyo El Gato las mediciones de contaminantes en este arroyo han detectado la presencia de metales pesados y fármacos lo cual podría explicar la toxicidad de estos sedimentos. El sitio 12 no provocó mortalidades altamente significativas, lo curioso de este sitio es que las larvas exhibieron un mayor crecimiento y desarrollo que las larvas control, esto puede deberse al alto contenido de materia orgánica de los sedimentos.

Problemática descargas cloacales: Los sedimentos de las descargas cloacales, provocaron mortalidades significativas en ambas especies para los estadios EG8 y EG30. Por otro lado, las larvas sobrevivientes presentaron un mayor crecimiento y desarrollo que las larvas del sitio control. Dichos resultados también fueron sustentados por los resultados obtenidos en el ensayo crónico, en el cual las larvas presentaron mortalidades significativas al comienzo del ensayo y las tasas de desarrollo fueron mayores alcanzando la metamorfosis en menor tiempo. A partir de los bioensayos con diluciones se pudo determinar que el sedimento sin diluir provocó mortalidades significativas e inhibición del crecimiento. En futuros ensayos se evaluará diluciones entre el 100% y el 75 a partir de la dilución 75/25

.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN DEL CAPÍTULO.

Los ensayos de toxicidad empleando larvas de anuros se han centrado en mayor medida en la exposición a través del agua (simulando la columna de agua ecosistemas acuáticos) como un modelo experimental simple. Estos estudios aportan información importante para la evaluación de la toxicidad de sustancias químicas sobre diferentes especies acuáticas, y útil para la caracterización de la sensibilidad de diferentes especies a dichos compuestos e incluso a otros estresores ambientales (Semlitsch & Bridges, 2005). Una de las críticas más significativas a las pruebas de toxicidad de laboratorio es la falta de realismo a la hora de evaluar el efecto que los estresores químicos podrían tener sobre los organismos en la naturaleza (Burkhart *et al.*, 2000). Por otra parte, y tal como se describió en la introducción del capítulo, el estudio de los sedimentos posee particular importancia ya que estos proporcionan hábitat para muchos organismos acuáticos. Además resulta un depósito de contaminantes, por lo tanto en los últimos años, el creciente interés se ha centrado en desarrollar y aplicar métodos para evaluar toxicidad de los sedimentos contaminados ya que estos permiten medir los efectos sobre los organismos acuáticos y evaluar los efectos de las mezclas de contaminantes, presentes en matrices complejas, además de ser altamente replicables (McCauley *et al.*, 2000).

Fue por tales motivos que para el presente trabajo de tesis se planteó como estrategia realizar ensayos siguiendo los protocolos ASTM y USEPA, empleando sedimentos completos, ya que se entiende que estos representan en mayor medida escenarios de exposición representativos y más realistas de las problemáticas ambientales locales planteadas, al considerar ecosistemas acuáticos.

Es importante mencionar que tal como se describió en detalle en la introducción, los anfibios poseen numerosas características biológicas, las que, sumadas a su diversidad morfológica, y a su presencia en la mayor parte de los ecosistemas, los perfilan como excelentes indicadores de la calidad del ambiente. Además existe en nuestro país la necesidad de generar procedimientos estandarizados, y herramientas de diagnóstico de la calidad del ambiente, que incorporen especies autóctonas, útiles para abordar problemas ambientales locales de manera más adecuada.

Según nuestro conocimiento hasta el momento en que se inició este trabajo de tesis (2015) existían pocos trabajos que empleaban larvas o embriones de anuros para evaluar la toxicidad de sedimentos tanto naturales (Fort *et al.*, 1999; Brand *et al.*, 2010; Peltzer *et al.*, 2013), como adicionados con algún contaminante Francis *et al.*, 1984, Douglas *et al.*, 1987 Sparling *et al.*, 2006 en los mismos se han utilizado las especies *Xenopus laevis*, *Hyla versicolor*, *Trachycephalus typhonius*, *Rana pipiens* y *Rana sphenocphala* respectivamente, existiendo solo protocolos estandarizados adecuados para especies exóticas (ASTM, 2007; USEPA, 1996)

Considerando esta información, el presente trabajo resulta el primero en emplear larvas de dos especies autóctonas (*R. arenarum* y *B. pulchella*) para evaluar la toxicidad de sedimentos mediante procedimientos estandarizados. Asimismo, el presente trabajo logra el desarrollo de una herramienta bioanalítica útil y necesaria para la evaluación de la calidad del ambiente incorporando dos especies de anuros autóctonos como indicadoras. (Protocolo descrito en el anexo III).

El análisis de los resultados obtenidos y de la experiencia adquirida durante el desarrollo del protocolo propuesto, permiten concluir que la adecuación y puesta a punto de los protocolos normalizados para ser utilizados con las especies autóctonas propuestas, se llevó a cabo exitosamente, alcanzando uno de los objetivos propuestos.

La aplicación del protocolo desarrollado para la realización de bioensayos con muestras de sedimentos utilizando larvas de anuros autóctonos, se ha utilizado con éxito para evaluar la toxicidad de muestras de sedimentos completos, provenientes de sitios con diferentes usos del suelo y actividades antrópicas. Los requerimientos de equipamiento para la realización del bioensayo fueron accesibles, por lo tanto, estas pruebas son relativamente simples, económicas y requieren de tiempos de ejecución relativamente cortos.

Los resultados obtenidos, permiten concluir que la utilización del protocolo propuesto permite evaluar la respuesta a nivel individual (efectos letales y subletales) de larvas de *R. arenarum* y *B. pulchella* en diferentes estadios de desarrollo. Esta información resulta útil para clasificar la toxicidad y peligrosidad de los sedimentos y realizar inferencias sobre la calidad de los ecosistemas evaluados.

Como se comentó en la introducción del capítulo el éxito de un bioensayo está influenciado por la elección de los organismos de prueba los cuales deben cumplir con determinados criterios (USEPA, 2002). Las dos especies de estudio consideradas para este trabajo de tesis (*R. arenarum* y *B. pulchella*) han sido propuestas como especies modelos por investigadores locales y en los últimos años la información ecotoxicológica generada se ha incrementado significativamente. Estos trabajos presentan evidencias sobre la sensibilidad de estas especies a varios de los contaminantes de interés ambiental (Ferrari *et al.*, 2008; Agostini, Natale & Ronco, 2009; Candiotti *et al.*, 2010; Junges *et al.*, 2010, 2013; Venturino, 2011; De Arcaute *et al.*, 2014; Brodeur, Poliserpi & Sánchez, 2014; Sotomayor *et al.*, 2012; Hojman *et al.*, 2015; Agostini *et al.*, 2016; Brodeur *et al.*, 2012; Suarez *et al.*, 2016; Pérez-Iglesias *et al.*, 2017; Pérez-Iglesias *et al.*, 2018; Natale *et al.*, 2018) y demuestran que estas especies son adecuadas para realizar estos procedimientos. Por otro lado, las puestas y larvas de ambas especies se encuentran fácilmente en el campo y la cría y mantenimiento en laboratorio es sencilla y factible (Ver capítulo 2) y existe información al respecto que puede ser consultada. Además, ambas especies poseen una amplia distribución, y son conspicuas y abundantes en la mayor parte de los ecosistemas que habitan. Están presentes en ambientes modificados y en particular son representativas de los sitios que se están evaluando, lo cual las hace localmente relevantes. Finalmente, las larvas de *R. arenarum* presentan hábitos bentónicos mientras que las larvas de *B. pulchella* presentan hábitos bentónicos-nectónicos lo cual favorece la interacción con los sedimentos, resultan tolerantes a las características físicoquímicas de los mismos, resultando especies adecuadas para su incorporación en este tipo de bioensayos.

Por lo expuesto anteriormente y los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que las dos especies seleccionadas respondieron de manera satisfactoria y resultan adecuadas para su incorporación como organismos prueba en este tipo de bioensayos.

En los bioensayos de toxicidad con sedimento completo con anuros, el punto final más comúnmente evaluado es la mortalidad. Comparando la respuesta de ambas especies en los mismos estadios pudimos determinar que *B. pulchella* resulta ser más sensible, presentando mayores porcentajes de mortalidad ante la exposición a una muestra tóxica, y además posee una mayor amplitud de respuesta, ya que resulta afectada por una mayor cantidad y variedad sedimentos provenientes de sitios contaminados que *R. arenarum*.

Al analizar la información existente sobre la sensibilidad de ambas especies, al ser expuestas mediante bioensayos de toxicidad aguda a contaminantes de referencia, encontramos que la diferencia en la sensibilidad entre larvas de *B. pulchella* y *R. arenarum* detectada en el presente trabajo de tesis, es coincidente con la información previamente publicada (Agostini *et al.*, 2009, 2010; Svartz *et al.*, 2014, 2015; Vera Candiotti, *et al.*, 2010; Natale, *et al.*, 2018). Si bien *R. arenarum* es la especie más utilizada en ensayos ecotoxicológicos en Argentina por sus características ecológicas, y su presencia en sitios modificados, se infiere que presenta una sensibilidad relativa bajas respecto de las demás especies de anuros autóctonos.

En ese sentido los resultados obtenidos en este capítulo, constituyen líneas de evidencia a favor de la utilidad de *B. pulchella* como especie modelo de estudio sensible y útil al momento de evaluar efectos en ecosistemas acuáticos.

Los resultados obtenidos permitieron evaluar el patrón de respuesta de las especies estudiadas en diferentes estadios del desarrollo y aportaron información relevante para alcanzar el objetivo específico 3. Al comparar los resultados obtenidos sobre la sensibilidad relativa entre diferentes estadios del desarrollo pudimos observar que para *B. pulchella* la etapa del desarrollo que presenta mayor sensibilidad fue EG8, mientras que para *R. arenarum* la sensibilidad parece estar relacionada de manera inversa con el desarrollo, resultado la etapa más sensible la EG8, luego EG25 y finalmente EG30. Estos resultados son acordes con los reportados por otros autores. En general, en los ensayos agudos (96hs) los embriones expuestos desde estadio blástula (EG4) y gástrula (EG11) muestran mayor tolerancia, esta menor sensibilidad es atribuida a la protección que genera la matriz gelatinosa de los huevos (Edginton, Rouleau, Stephenson, & Boermans, 2007; Ortiz-Santaliestra & Sparling, 2007), por otro lado, los estadios en los cuales se comienzan a formar los órganos (EG18-21) son más susceptibles (Aranzon *et al* 2013), en el caso de las exposiciones más prolongadas como las realizadas en este trabajo (10 días) los embriones son expuestos desde E8 y las etapas de organogénesis ocurren durante la exposición, por lo tanto se evidencian mayores efectos, ya sea letales como subletales. Por otro lado, las larvas E25 presentan estructuras sensibles y diversas las que constituyen más vías de ingresos para los tóxicos (Ortiz-Santaliestra & Sparling, 2007)lo cual podría explicar el patrón de respuesta observado por *R. arenarum*.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la etapa más sensible del desarrollo en ambas especies, evaluadas por medio del protocolo propuesto es la etapa embrionaria EG8. También los diferentes bioensayos realizados aportan evidencias que indican una disminución de la sensibilidad de los individuos conforme crecen y se desarrollan.

Al contextualizar los resultados obtenidos y la información generada en relación a la hipótesis: “Los bioensayos de toxicidad con sedimentos empleando larvas de *R. arenarum* y *B. pulchella* resultan una herramienta eficaz para clasificar la toxicidad y peligrosidad de sedimentos asociadas a compuestos tóxicos presentes en lo sedimentos de los sitios de estudio”, podemos concluir que la herramienta desarrollada y aplicada junto con sus

variantes permitió caracterizar y ordenar las muestras de sedimentos según su toxicidad, permitiendo establecer un orden de peligrosidad de sedimentos, el que se presenta a continuación de mayor a menor: Industrial > Urbano = Descargas Cloacales > Agrícola > Referencia.

Los resultados permiten concluir que los bioensayos de toxicidad con sedimentos empleando larvas de *R. arenarum* y *B. pulchella* resultan una herramienta eficaz para clasificar la toxicidad y peligrosidad de sedimentos asociadas a compuestos tóxicos presentes en los sedimentos de los sitios de estudio

Al comparar los resultados obtenidos al aplicar el protocolo propuesto para realizar bioensayos de sedimentos con larvas de *B. pulchella* con un ensayo estandarizado de referencia como lo es el de *H. curvispina*, se pudo observar que la especie *H. curvispina* resultó ser más sensible, lo que era de esperar considerando el perfil químico del agroecosistema, por otro lado, la especie *B. pulchella* brindó información complementaria y significativa, por lo tanto concluimos **que el bioensayo con sedimentos aplicando el protocolo propuesto para *B. pulchella* brinda resultados acordes y complementarios respecto del bioensayo estandarizado de *H. curvispina***. Por lo tanto, los resultados obtenidos validan la utilización del protocolo propuesto para evaluar toxicidad de sedimentos y apoyan la propuesta de utilizar a *B. pulchella* como una especie modelo para diagnosticar la calidad ambiental.

Al comparar las diferentes problemáticas considerando cada uno de los sitios evaluados, se puede observar que la problemática industrial caracterizada por la petroquímica presentó los sitios con sedimentos más tóxicos, seguida de la problemática de descargas cloacales, la urbana y por último la agrícola.

En la caracterización fisicoquímica de los sitios de la problemática industrial y urbana se evidenciaron altas concentraciones de metales pesados, los cuales es sabido que, en exposiciones a sedimentos adicionados, provocan mortalidades significativas en anuros (Dawson *et al* 1988; (Francis, Birge, & Black, 1984), por otro lado, en la zona de la petroquímica se detectaron altas concentraciones de hidrocarburos los cuales podrían ser los responsables de las altas mortalidades registradas en los individuos expuestos a muestras de sedimentos provenientes de estos sitios.

Los resultados de la evaluación del patrón de respuesta a nivel individual, en particular efectos subletales, de larvas de *R. arenarum* y *B. pulchella* en diferentes estadios del desarrollo empleando el protocolo propuesto permitió obtener información de base sobre la sensibilidad en la respuesta de los puntos finales comúnmente evaluados y compararlos con

la frecuencia de ocurrencia de diferentes tipos de anomalías, y la sensibilidad de este punto final.

Los resultados obtenidos de los efectos subletales evaluados, tales como crecimiento de las larvas en los bioensayos con sedimento completo realizados en este trabajo mostraron una gran sensibilidad de respuesta a la contaminación asociada a los sedimentos de los sitios estudiados. La evaluación de dichos efectos subletales permitió clasificar sedimentos con un grado moderado de contaminación.

El crecimiento como punto final de evaluación en los anuros puede ser medido por medio del peso y/o longitud. En los ensayos con sedimento si bien las larvas son alimentadas de manera equitativa, producto de su modo de vida incorporan alimento al ingerir sedimento. Dependiendo de la cantidad de nutrientes, la cantidad y calidad de materia orgánica presente, en cada una de las muestras evaluadas, podrá incorporar cantidades variables y no controladas de alimento, lo que tendrá como consecuencia un efecto en el crecimiento, pudiendo reportarse un crecimiento reducido (Lefcort, Hancock, Maur, & Rostal, 1997), como un aumento del crecimiento el que se verá influenciado además por los efectos de las sustancias químicas presentes y las condiciones de prueba (Rowe *et al.*, 1998). En el presente trabajo de tesis la evaluación de este punto final permitió demostrar toxicidad en todas las muestras de sedimentos provenientes de las problemáticas ambientales evaluadas, se lograron detectar inhibiciones significativas del crecimiento en las larvas expuestas a sedimentos de los sitios de la problemática industrial (S 15 y en menor medida 16, 17 y 18), urbana (S 11) y agrícola (Sitio 5), mientras que los sedimentos provenientes de la problemática de descarga de efluentes cloacales y algunos sitios urbanos provocaron aumentos significativos del crecimiento (cuando no exhibieron mortalidad). Estos resultados aportaron información relevante y complementaria a la obtenida al evaluar mortalidad, pudiéndose observar asociaciones entre una baja tasa de mortalidad y el aumento en la respuesta de efectos sobre el crecimiento.

Como se comentó en la introducción del capítulo 2 el desarrollo de los anuros, así como su crecimiento y supervivencia están condicionados por numerosos factores. En los ensayos realizados en esta tesis los efectos sobre la duración del periodo larval, y las tasas de desarrollo se lograron evidenciar en larvas expuestas desde embriones EG8 y desde estadio 30 (no así en los ensayos a partir de EG25). Al igual que a partir de la evaluación del crecimiento, se evidenciaron efectos sobre el desarrollo de los individuos expuestos a sitios de la petroquímica (S 15) de la problemática urbana (S13) y agrícola (S 6, 7 y 8) los que presentaron una disminución de la tasa de desarrollo, así como también el efecto contrario evidenciado como un aumento en la tasa de desarrollo de los individuos expuestos a sedimentos provenientes de sitios con influencia de las descargas cloacales y problemática urbana (S 12).

A modo de conclusión parcial se puede destacar la utilidad del análisis de las tasas de crecimiento y desarrollo, como puntos finales de evaluación válidos aplicables en bioensayos de toxicidad con sedimento completo. La evaluación de estos puntos finales en conjunto, aportan información complementaria a la evaluación de efectos letales, destacando la importancia de analizar efectos a nivel subletal de relevancia ecológica.

La expresión de anomalías morfológicas, y el análisis de las frecuencias de ocurrencia resultan una herramienta útil y de fácil determinación y responde apropiadamente por lo tanto concluimos que resultan buenos puntos finales de evaluación ecotoxicológicos

En el presente trabajo se analizaron los individuos expuestos a diferentes tratamientos y se detectaron 10 tipos de anomalías consideradas relevantes y cuya frecuencia de ocurrencia resultó significativa desde el punto de vista estadístico. Estas fueron: Flexiones en la cola, cuerpos cóncavos, cuerpos asimétricos, cuerpos hinchados, edemas, intestino desplazado y/o reducido, hipopigmentación, ausencia de queratodontes y/o pico córneo.

El mayor porcentaje de individuos con anomalías se observó para la especie *R. arenarum* y para el estadio de huevo.

El análisis de la información generada permitió corroborar la hipótesis que las larvas expuestas a sedimentos provenientes de sitios contaminados, presentan una mayor frecuencia en la ocurrencia de anomalías, respecto a larvas expuestas a sedimentos de sitios de referencia.

Un próximo paso sería protocolizar o normalizar procedimiento según normas consensuadas (tipo IRAM) para que estas valiosas herramientas aquí desarrolladas se puedan incorporar en programas de conservación y de manejo de recursos naturales.

CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN DE LARVAS A CAMPO

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.2 Anfibios como bioindicadores de calidad ambiental.

Los bioindicadores, “son organismos (o parte de un organismo o una comunidad de organismos) que contiene información sobre la calidad del medio ambiente (o una parte del medio ambiente)” (Markert, Breure, & Zechmeister, 2003). La utilización de especies indicadoras de la calidad ambiental, se basa en el supuesto de que el estado de salud que presentan los individuos, las poblaciones y/o las comunidades refleja las condiciones ambientales locales y responden a la alteración antropogénica de esas condiciones (Agency, 2008). Estos organismos poseen atributos singulares, que permiten a partir de alteraciones en los mismos, realizar inferencias sobre fenómenos, procesos o acontecimientos, actuales o pasados ocurridos en su entorno o ambiente. Estos organismos manifiestan efectos en respuesta a la exposición a un determinado elemento, sustancia o mezcla. Tales efectos pueden producir cambios individuales a diferentes niveles: nivel bioquímico, fisiológico y de comportamiento e incluso afectar la supervivencia, y provocar efectos a niveles ecológicos superiores (estructura de la población, comunidad o ecosistemas) (Newman & Clements, 2007)

Los bioindicadores pueden ser clasificados como indicadores de prueba o de monitoreo. Los organismos de prueba son utilizados principalmente en el uso de pruebas de laboratorio (del tipo bioensayo de toxicidad). Los organismos de monitoreo (=biomonitores) incluyen a todos los organismos empleados en seguimientos cuantitativos y cualitativos de los niveles de contaminantes de un ecosistema y sus posibles repercusiones sobre el mismo (Arndt & Schweizer, 1991). Este tipo de indicadores pueden ser activos, cuando una especie u organismo es introducido en algún medio con el fin de realizar mediciones, o pasivos cuando los organismos ya se encuentran presentes en el ecosistema y son examinados con el fin de analizar su reacción (Environment Agency, 2008).

Para seleccionar un bioindicador específico, de acuerdo con (Holt & Miller, 2011), el organismo a seleccionar debe tener ciertas características como, por ejemplo, brindar una respuesta medible (biomarcador) que sea sensible y refleje la reacción de la población o comunidad entera, su respuesta debe guardar correlación con el nivel de contaminación o degradación presente en el ecosistema. Además, un bioindicador debe ser abundante y de amplia distribución en el área de estudio, con densidad poblacional local alta y estabilidad a pesar de variaciones ambientales y climáticas. Por último, debe estar bien estudiado su comportamiento, su ciclo de vida y su biología en general, además de que esta información

esté disponible y publicada, de modo tal que se encuentre documentado taxonómicamente y sea fácil y económico de monitorear (Holt & Miller, 2011).

Los anuros presentan ciertas características en sus modos de vida que los hacen propensos a la exposición e interacción a contaminantes ambientales. Entre estas características podemos mencionar su ciclo de vida bifásico por el cual pueden estar expuestos a una variedad de contaminantes en el medio acuático, como en el terrestre, una piel altamente permeable que facilita la absorción de contaminantes, una sensibilidad relativa, de moderada a alta a numerosos compuestos de referencia en pruebas de toxicidad aguda y crónica en comparación con otros organismos acuáticos y además poseen temporadas reproductivas cortas en donde quedan expuestos a eventos puntuales de (Blaustein & Wake, 1995; Brodeur & Candiotti, 2017; Guzy *et al.*, 2012; Wake, 1991)

Parte de esta sensibilidad queda evidenciada por el fenómeno conocido como Declinación Global de las Poblaciones de Anfibios, desde hace más de dos décadas se han venido publicando trabajos que evidencian una creciente disminución de las poblaciones de anfibios a nivel global (Collins, Crump, & Lovejoy III, 2009; Houlahan, Findlay, Schmidt, Meyer, & Kuzmin, 2000; Young, Stuart, Chanson, Cox, & Boucher, 2004). Entre los factores ambientales propuestos como causantes de esta disminución se destacan la degradación de hábitats por contaminación química y biológica y su pérdida por alteración irreversible y/o fragmentación (Blaustein & Kiesecker, 2002; Croteau, Davidson, Lean, & Trudeau, 2008; Sparling, Linder, Bishop, & Krest, 2010). La vulnerabilidad de numerosas especies ha sido ampliamente documentada en el contexto de categorización de especies con fines de conservación (IUCN, 2014). Específicamente en Sudamérica, varios estudios ecotoxicológicos reflejan la sensibilidad de diferentes especies de anuros locales a diversas familias de contaminantes (mayormente plaguicidas) mediante la evaluación de respuestas a diferentes niveles de organización en pruebas de toxicidad aguda (Bioensayos) (Agostini, Natale, & Ronco, 2009; Attademo *et al.*, 2014; Candiotti, Natale, Soloneski, Ronco, & Larramendy, 2010; Lajmanovich, Cabagna, Peltzer, Stringhini, & Attademo, 2005; Peltzer *et al.*, 2013). Pero los estudios a campo son escasos (Agostini *et al.*, 2013; Goldberg, 2015; Peltzer *et al.*, 2011). En la actualidad los estudios ecotoxicológicos proponen nuevas herramientas experimentales que presenten mayor realismo ecológico, alejándose de los diseños simplificados y buscan escenarios que se aproximen a la realidad, tales como las interacciones entre diversos contaminantes, la influencia de las variables ambientales en la sensibilidad a la contaminación, los estudios de efectos a nivel poblacional y la combinación de estudios de laboratorio y campo (Semlitsch & Bridges, 2005). Por otro lado, se ha motivado la necesidad de realizar estudios con especies nativas que permitan obtener información de la biología y sensibilidad de estas especies para poder seleccionar adecuadamente especies indicadores. Uno de los objetivos de este trabajo es contribuir con información en ese sentido.

4.1.3 Factores que determinan la magnitud del impacto de la contaminación

En el medio natural, la sensibilidad de cada individuo a un contaminante, está condicionada por una gran cantidad y diversidad de factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, ya sean naturales o de origen antrópico, cuya interacción conformará un escenario de exposición determinado el cual, luego de interactuar con el organismo o individuo en cuestión, podrá provocar o no, un efecto sobre dicho individuo.

El escenario fisicoquímico que condiciona la exposición, es objeto de estudio de la Química Ambiental, pero resulta de interés para el desarrollo de estudios ecotoxicológicos (Manahan, 2011).

Por otra parte, la exposición de los individuos a los contaminantes también está influenciada por las características biológicas de los individuos, los que a través del comportamiento condicionan la exposición o la pueden evitar. En lo que respecta a las características propias de los individuos, sabemos que el estadio de vida condiciona la sensibilidad a la contaminación (Ortiz-Santaliestra & Sparling, 2007). Por ejemplo, las envolturas gelatinosas de los huevos de los anuros pueden proteger a los embriones de la contaminación (Edginton, Rouleau, Stephenson, & Boermans, 2007), por otro lado, cuando las larvas eclosionan y comienzan a alimentarse experimentan un cambio significativo en las condiciones del medio, lo que podría aumentar la sensibilidad a ciertos contaminantes, los que incluso pueden ser ingeridos (nueva vía de ingreso) y pueden transformarse en el tracto digestivo en sustancias más tóxicas (Huey & Beitinger, 1980). Por otra parte, las larvas de mayor edad generalmente resultan más tolerantes que las jóvenes debido a varias razones como por ejemplo un mayor tamaño y consecuentemente una relación superficie volumen menor; la presencia de branquias internas cubiertas y piel más gruesa, lo cual reduce la superficie de contacto con el medio y las protege frente a la asimilación de agentes químicos y el estrés osmótico (McDiarmid & Altig, 1999); además de cuestiones fisiológicas como por ejemplo mayores capacidades detoxificantes (Bryszewska *et al.*, 2011).

Los ambientes temporales que habitan los anuros también condicionan la sensibilidad que estos presentan, por ejemplo, es sabido que las especies que habitan ambientes temporales heterogéneos e inestables pueden desarrollar plasticidad fenotípica, la cual se define como la propiedad de un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Pigliucci, Murren, & Schlichting, 2006). Por lo tanto, los individuos pueden alterar su bioquímica, fisiología, tasas de desarrollo, morfología o conducta en respuesta a determinadas señales del ambiente que habitan (Agrawal, 2001). Estos cambios están regulados genéticamente, pueden o no ser heredables y responder a la selección natural (DeWitt & Scheiner, 2004; Relyea, 2005; Zhivotovsky, Feldman, & Bergman, 1996).

Por otro lado, la exposición a diferentes historias de vida en relación con el ambiente, o cambios recientes en el ambiente por contaminación puede hacer que determinadas metapoblaciones de ciertas especies resulten más tolerantes que otras, ya sea por cambios fisiológicos (aclimatación) o pudiendo darse casos de adaptación local (genéticos) a la contaminación (Johansson, Primmer, & Merilä, 2007).

La posible adaptación genética a la contaminación podría tener, no obstante, un costo evolutivo elevado, al reducir la diversidad genética de la población, con la consiguiente pérdida de plasticidad para responder a procesos estocásticos futuros (Medina *et al.*, 2007), además de la pérdida de la variabilidad.

4.1.4 Efectos subletales

Lo más habitual es que los niveles ambientales de contaminación no superen el umbral de tolerancia y no provoquen la mortalidad directa de los individuos, sino que ejerzan efectos subletales, ya sea por exposiciones cortas (agudas) o por periodos prolongados (crónicas).

Los efectos en el crecimiento y desarrollo se han empleado como puntos finales subletales sensibles a la contaminación, y biológicamente relevantes. Muchos trabajos ponen de manifiesto que la exposición a la contaminación puede acelerar o retrasar tanto la eclosión, como las tasas de desarrollo, e incluso la metamorfosis de los individuos (Distel & Boone, 2009; Griffis-Kyle & Ritchie, 2007; Hayes *et al.*, 2006; Sparling & Fellers, 2009). Como se describió en el Capítulo 2, (Wilbur & Collins, 1973), propusieron un modelo teórico que explica los factores que influyen sobre los procesos de desarrollo, crecimiento y supervivencia de larvas. La aceleración del desarrollo ante condiciones desfavorables puede implicar un menor tamaño en la metamorfosis, reduciendo la probabilidad de sobrevivir en el medio terrestre por poseer una condición física disminuida (Altwegg & Reyer, 2003). Por otra parte un retraso de la metamorfosis conlleva que los individuos metamorfoseen con tamaños más grandes (lo que resultaría ventajoso para la supervivencia en el medio terrestre), pero también implica un mayor tiempo de permanencia en el medio acuático, lo que se asocia con un mayor riesgo de exposición a contaminantes, además de a los factores biológicos como fenómenos de competencia o depredación y dicho retraso incrementa el riesgo de no completar el desarrollo acuático antes de la desecación de los cuerpos de agua. Además de las alteraciones producidas por factores ambientales, el desarrollo puede verse afectado por contaminantes que afectan específicamente el sistema endócrino, en la actualidad, el estudio de los disruptores endocrinos, ha recibido gran atención. Los disruptores endocrinos se definen como un grupo de sustancias químicas de muy diferente origen, estructura y uso, que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción biológica o eliminación de las hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y regulación del desarrollo (Serrano, Cabrera, & Olmedo, 2001). Muchos de estos compuestos no se consideraban significativos en términos de distribución y/o concentración en el medio

ambiente ya que no eran detectados por las técnicas analíticas. Pero la detección de efectos biológicos y el desarrollo de técnicas permitió el abordaje de esta problemática, no obstante, ahora se los considera contaminantes emergentes y están siendo ampliamente detectados y estudiados (da Silva *et al.*, 2018). La principal forma de entrada de estos contaminantes en los cuerpos de agua son los efluentes urbanos. Las aguas residuales no tratadas o con tratamiento primario y la eliminación inadecuada de residuos de drogas contienen estos contaminantes resistentes que son difíciles de eliminar y persisten en el ambiente (D'ascenzo *et al.*, 2003). En particular para los anuros, los disruptores endocrinos que alteran la función de la tiroides pueden inhibir la metamorfosis por completo (Ortiz-Santaliestra & Sparling, 2007) resultando un factor preocupante debido a su relevancia e implicancias ecológicas.

El comportamiento, en particular el efecto sobre la actividad natatoria, también es un reconocido efecto subletal sensible a la contaminación, pero si bien hasta hace poco tiempo no estaba muy estudiado (Hatch & Blaustein, 2000) su estudio está en progreso en relación al desarrollo de técnicas tipo tracking (Denoël *et al.*, 2013; Junges, Maglianese, Lajmanovich, Peltzer, & Attademo, 2017), que a partir de registro de video permiten obtener información mediante programas específicos, incluso se ha constituido una rama de la Ecotoxicología denominada Eto-Ecotoxicología, o Ecotoxicología del comportamiento. Muchas sustancias químicas afectan la transmisión del impulso nervioso (Widder & Bidwell, 2008), lo que generalmente se manifiesta en la actividad muscular, esto posee consecuencias sobre aspectos como la actividad natatoria, capacidad de desplazamiento, y los consecuentes efectos sobre el uso del hábitat, alimentación y respuesta a depredadores (Egea-Serrano, Tejado, & Torralva, 2009; E García-Muñoz, Guerrero, & Parra, 2009; Enrique García-Muñoz, Guerrero, & Parra, 2011; Shinn, Marco, & Serrano, 2008). Esto puede a su vez comprometer la capacidad de los individuos afectados para encontrar alimento, y en consecuencia afectar su estado energético, consecuentemente su tasa de crecimiento y desarrollo (Egea-Serrano *et al.*, 2009) y evidenciarse sobre numerosos parámetros indicadores del estado de salud.

El desarrollo de anormalidades, también se ha asociado con la exposición a diferentes clases de contaminantes. La mayoría de los estudios son realizados en laboratorio, detectando anormalidades sobre todo durante las fases iniciales del desarrollo. Los estudios a campo por otro lado son escasos y centrados principalmente en anuros adultos. La revisión más reciente fue la realizada por (Henle & Dubois, 2017), quien sintetiza la información existente proveniente de estudios en anormalidades externas que se han informado u observado en poblaciones de anfibios en la naturaleza. Ellos concluyen que gran parte de la bibliografía que refiere a anormalidades de anfibios en campo está dispersa y aborda observaciones anecdóticas de 1–2 individuos y tipos de anormalidades, por otro lado, hay un número menor de trabajos que informan sobre la presencia de individuos anormales en grandes cantidades y porcentajes, en los llamados “hotspot” que son áreas donde hay una especial concentración de individuos anormales.

La manifestación de anomalías en anuros, como ya se comentó en el Capítulo 2 puede ocurrir por alteraciones en las etapas más sensibles del desarrollo (embriogénesis, eclosión y metamorfosis), provocando efectos sobre las etapas posteriores de vida de los individuos y pudiendo derivar en patologías o incluso la muerte (Sparling *et al.*, 2010).

En ambientes naturales, la ocurrencia de anomalías en adultos posee una tasa de ocurrencia baja, dentro de un rango del 2 % según (Ouellet, 2000). Por otro lado, (Blaustein & Johnson, 2003) consideran que no más de un 5% de una población de anfibios puede presentar anomalías morfológicas. En cuanto a las larvas de anfibios el nivel basal de ocurrencia natural se encuentra por debajo del 5 % (Read, 1997), sin embargo, hay reportes de poblaciones que superan ese porcentaje (Severtsova, Aguillon-Gutierrez, & Severtsov, 2012; Vershinin, 1989).

Numerosos factores fueron propuestos como causantes de altas prevalencias de anomalías en poblaciones naturales de anuros, entre los cuales podemos mencionar, los factores genéticos que, combinados con otros factores dan origen a alteraciones en el desarrollo (Gilbert & Epel, 2009). Por ejemplo, alteraciones en la coloración de los individuos como los observados en la rana *Bombina orientalis* la cual presenta un gen recesivo mutante (Pale) que en los individuos homocigotos produce una coloración más clara y defectos en la retina, desde la etapa larvaria (Ellinger, 1980), o el albinismo, el cual se da por una mutación en la cual se inhibe la vía de biosíntesis de melanina (Kamaraj & Purohit, 2014).

Otro de los factores causantes de anomalías son los agentes infecciosos como virus, bacterias, hongos y parásitos. Por ejemplo, el virus denominado *Ranavirus* ocasiona una respuesta inmunológica caracterizada por hinchazón de extremidades y del cuerpo, enrojecimiento de la piel, hematomas, lesiones pequeñas hemorragias y en larvas produce la decoloración cutánea (Gray & Chinchar, 2015; Gray, Miller, & Hoverman, 2009; Miller, Gray, & Storfer, 2011). La bacteria *Aeromonas hydrophila* causa la enfermedad de las patas rojas caracterizada por la presencia de úlceras y lesiones focales en la piel de las extremidades y cola (Emerson & Norris, 1905). Uno de los hongos más estudiados en relación al fenómeno de declinación global de anfibios es el *Batrachochytrium dendrobatidis* que ocasiona la enfermedad quitridiomycosis, esta enfermedad puede causar alteraciones del comportamiento, posturas anormales, anomalías en partes de la boca, e incluso la muerte (Blaustein *et al.*, 2005). Otros de los agentes infecciosos son los parásitos, un ejemplo de ellos es el trematodo *Ribeiroia ondatrae* el cual ocasiona una gran cantidad de anomalías en las extremidades de los anfibios (Johnson, Lunde, Haight, Bowerman, & Blaustein, 2001; Johnson, Lunde, Ritchie, & Launer, 1999; Johnson *et al.*, 2002).

Las anomalías ocasionadas por factores ambientales también fueron estudiadas en larvas de anfibios, por ejemplo es sabido que la exposición crónica a rayos ultravioleta ocasiona lesiones en piel, ojos, cuerpo y extremidades (Blaustein & Johnson, 2003; Blaustein,

Kiesecker, Chivers, & Anthony, 1997; Burkhart *et al.*, 2000). Por otro lado, la exposición a dispositivos de sonda magnética (magnetismo), ocasiona en los individuos expuestos alteraciones en la columna (escoliosis), menor crecimiento, extremidades supernumerarias, ausencias de ojos, edemas y espina bífida (Boga *et al.*, 2016). La exposición a estrés térmico también es otro ejemplo, los individuos expuestos pueden presentar anomalías (Elsdale, Pearson, & Whitehead, 1976).

Por último, pero no por eso menos importantes, son las anomalías ocasionadas por la exposición a contaminantes las cuales son objeto de estudio de la ecotoxicología y de este trabajo de tesis. En el Capítulo 2 se realizó una búsqueda bibliográfica de trabajos ecotoxicológicos en los que se reportaran anomalías ocurridas en larvas de anfibios por exposición a contaminantes de relevancia ambiental. Entre los contaminantes más estudiados se encuentran los plaguicidas y luego los metales pesados, los cuales reportan diferentes tipos de anomalías, por ejemplo, flexiones de la cola, edemas, alteraciones en los ojos, ausencia o disposiciones anormales de queratodotes entre otros.

De lo anteriormente expuesto, podemos deducir que, las ocurrencias de anomalías en larvas de anuros tienen diversas etiologías, y son muy variadas en cuanto a la estructura morfológica que afectan. Algunas anomalías, probablemente no sean producto del efecto de un solo factor, sino de todas las posibles combinaciones de factores que pueden actuar en conjunto.

Además de los efectos que pueden tener lugar por interacción (contacto directo de los individuos con los contaminantes), algunas sustancias ejercen un efecto indirecto como por ejemplo impacto a través de la cadena trófica. Por ejemplo, la presencia de fertilizantes o insecticidas en ecosistemas acuáticos puede incrementar la biomasa de fitoplancton y perifiton al incrementar los nutrientes y poseer un efecto negativo sobre el zooplancton (Relyea & Jones, 2009), lo que supone un incremento de recursos para las larvas de anuros (Boone, Semlitsch, Little, & Doyle, 2007). Además, algunas de las especies de algas cuyo crecimiento se ve favorecido pueden producir toxinas (Camargo & Alonso, 2006) que afecten negativamente al crecimiento y desarrollo de los anuros (Oberemm, Becker, Codd, & Steinberg, 1999). Por otra parte, la sensibilidad de insectos o peces que cumplen rol de depredadores a un determinado compuesto puede ser diferente a la de los anuros (Kerby, Richards-Hrdlicka, Storfer, & Skelly, 2010) lo que modificará la relación depredador-presa en uno u otro sentido dependiendo de cuál sea el taxón más sensible.

Considerando todo lo antedicho, los efectos producidos por los contaminantes sobre los organismos en la naturaleza, pueden resultar muy diferentes a las observados en pruebas de laboratorio, ya que en las situaciones reales se imponen un conjunto de factores estresantes que la exposición a menudo simplista del entorno del laboratorio no aborda. Por lo tanto, realizar estudios con mayor escala, mesocosmos, o de semi-campo y campo sin dudas brindará información más relevante desde el punto de vista ecológico para predecir los

efectos que los contaminantes y estresores químicos podrían tener sobre los organismos (Burkhart *et al.* 2000).

Es por ello que considerando el marco conceptual que precede a esta tesis doctoral en el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos al evaluar grupos de larvas provenientes de ecosistemas acuáticos afectados por distintos tipos de actividades antrópicas utilizando, como biomarcadores, el conjunto de caracteres morfológicos externos (anormalidades) propuestos en los Capítulos 2 y 3 y caracteres morfológicos internos.

Hipótesis

1. Las larvas de anuros son buenas indicadores de la calidad de los ecosistemas que habitan.
2. Las larvas provenientes de los sitios afectados por las actividades antrópicas estudiadas, presentan mayor prevalencia de anormalidades respecto a los sitios de referencia.
3. La morfología de las larvas y en particular, la expresión de anormalidades es un buen biomarcador de la calidad del ambiente en donde habitan.

Objetivos

1. Evaluar grupos de larvas provenientes de ecosistemas acuáticos afectados por distintos tipos de actividades antrópicas utilizando, como biomarcadores, el conjunto de caracteres morfológicos externos (anormalidades) propuestos en los Capítulos 2 y 3.
2. Realizar un estudio de anormalidades presentes en los órganos internos de larvas provenientes de ecosistemas acuáticos afectados por distintos tipos de actividades antrópicas.
3. Elaborar una propuesta de nomenclatura que unifique la información existente sobre anormalidades en larvas de anuros, acompañada de una descripción, ponderando su importancia y relevancia al momento de evaluar factores de estrés.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Área de estudio

Dentro del área de estudio descrita en detalle en el Capítulo 1 (Figura 1.1) y como se especificó previamente, se identificaron cuatro problemáticas ambientales en función de las actividades antrópicas y uso del suelo de la Ciudad de La Plata y alrededores, a saber, agricultura, actividad urbana, actividad industrial y descargas cloacales además de una zona de Referencia. Dentro de estas problemáticas se seleccionaron sitios de estudio (n=21) siguiendo una serie de criterios (Capítulo 1, Figura 1.1, Tabla 1.3).

En los diferentes sitios de estudio se realizaron relevamientos dos veces al año, considerando los eventos reproductivos de las especies estudiadas, con el fin de detectar la presencia y reproducción de las mismas (Capítulo 1). En los casos en los cuales no se detectó la presencia de las especies se buscaron sitios cercanos en los cuales se constató la reproducción de la especie.

4.2.2 Toma de muestras

En las zonas de estudio se realizaron relevamientos para detectar la presencia de especies de anuros y constatar el uso del hábitat y/o la reproducción (Ver capítulo 1). Una vez identificados los sitios en los cuales se reproducen las especies de interés se realizaron muestreos de larvas aplicando técnicas propuestas por (Heyer, 1994). Se utilizaron redes de mano de 25 cm de diámetro con malla de 1 mm de poro, con tasas de paso de 1 m, en la superficie, sumergidas entre 10 cm y 15 cm dependiendo la profundidad del sitio de muestreo. En cada sitio de estudio se seleccionaron tres sectores en los cuales se pasó el copo por triplicado contabilizando el número de larvas colectadas por copo, posteriormente, si el número colectado de larvas era menor a 20 se continuaba pasando hasta obtener el tamaño de muestra establecido para el análisis de anormalidades (mínimo de 20 larvas).

El contenido de cada copo fue depositado en una batea y posteriormente las larvas colectadas se separaron en frascos de 100 ml con solución de MS 2-22 para ser anestesiadas. Cuando las larvas ya no presentaban movimientos se pasaron a frascos, previamente rotulados, de 100 ml con Formaldehído al 10%, para ser fijadas y trasladadas al laboratorio. En laboratorio el formol fue renovado a los 7 días y se guardaron hasta su análisis. (Figura 4.1).

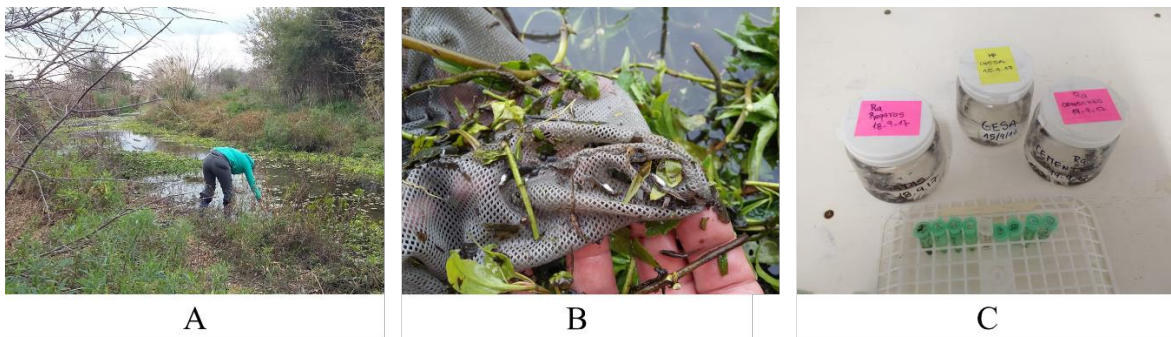


Figura 4.1 Muestreos de larvas en campo. A- Toma de muestras. B- Red con lavas. C- Muestras fijadas en frascos rotulados.

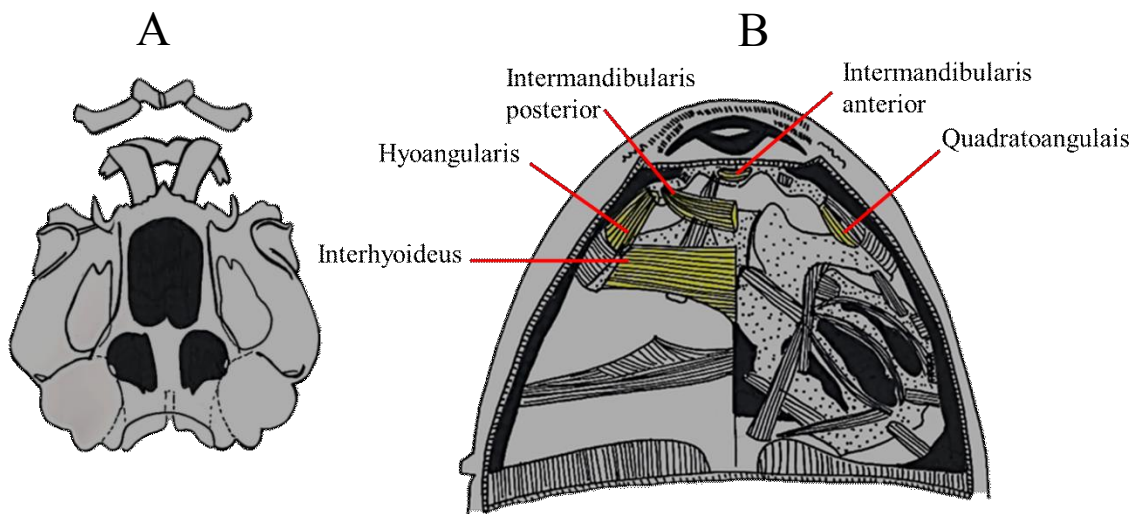
4.2.3 Procesamiento y abordaje de la morfología larvaria

En laboratorio, a la totalidad de las larvas colectadas se les asignó un número de referencia, se las fotografió y se analizaron individualmente registrando para cada individuo la longitud del cuerpo, la longitud total y el ancho del cuerpo (mediante el programa ImageJ® versión

1.46r: Rasband, EE. UU.), el peso (mediante balanza digital de precisión 0,001 gr) y el estadio de desarrollo de acuerdo con la calificación propuesta por Gosner (1960). Además, mediante la observación detallada bajo lupa estereoscópica, se determinó la presencia de parásitos externos y la presencia de anomalías, las cuales fueron clasificadas y cuantificadas siguiendo los criterios generados en el Capítulo 2.

Para la descripción y análisis de la anatomía interna se realizó una selección de 10 larvas de ambas especies por sitio, en estadios avanzados de desarrollo (36- 42) de Gosner. Cada individuo fue diseccionado e inspeccionado en detalle, bajo lupa estereoscópica para analizar la morfología interna (ver siguiente párrafo), describiendo y cuantificando la presencia de anomalías o lesiones en los órganos internos, así como también la presencia de parásitos. Además, se midió el peso del hígado de cada larva para, posteriormente calcular el índice hepatosomático (Peso del hígado/peso del individuo).

La descripción de estructuras comprendió el desarrollo de los músculos del aparato mandibular (Intermandibularis anterior y posterior, Hyoangularis, Interhyoideus, Quadratoangularis, Levator mandibularis superficialis, Levator mandibularis profundus y Levator mandibularis anterior) y el condrocráneo (Figura 4.2). Para la observación de estas estructuras el material fue teñido para cartílago y hueso siguiendo la técnica de (Taylor & Van Dyke, 1985), interrumpiendo el proceso previo a la diafanización. Posteriormente, el material fue pasado por una serie de alcoholes (70, 96 y 100) para que cada paquete muscular quede bien marcado. Finalmente se procedió a la diafanización y conservación en glicerina con el fin de observar y describir el condrocráneo según (Cannatella, 1999). Para la musculatura hioidea y branquial se siguió a (Haas & Richards, 1998) y (Haas, 2003) y para musculatura mandibular a (Haas, 2001).



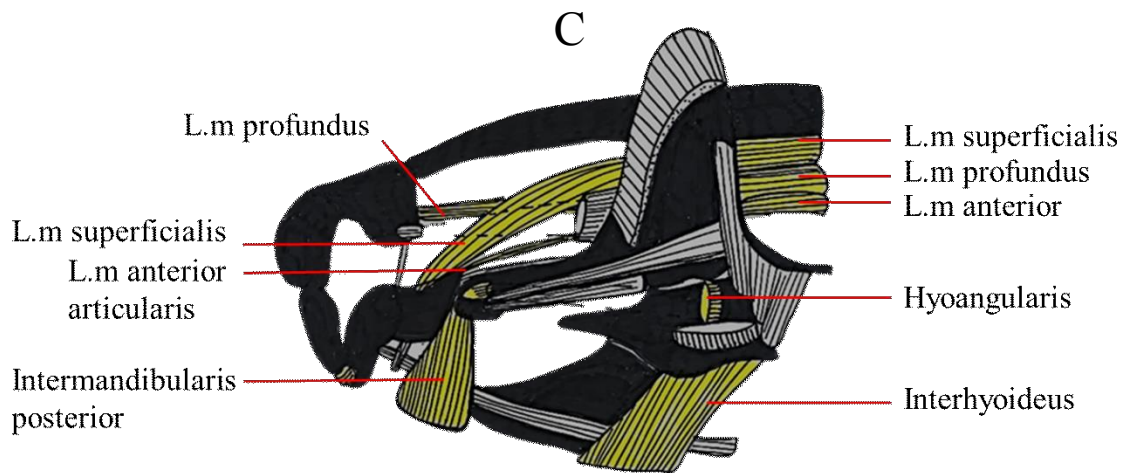


Figura 4.2. A- Vista dorsal de condrocráneo, B-Vista ventral de los músculos del aparato branquial y mandibular C-Vista lateral de los músculos y tendones del aparato mandibular. L. m: Levator mandibulae (Modificado de Canatella 1999)

Se realizaron estudios histopatológicos en larvas que presentaron anomalías altamente significativas. Para ello, las muestras fijadas se procesaron de forma rutinaria y se incluyeron en cera de parafina (Plaul *et al.*, 2017). Las secciones histológicas se cortaron por microtomo de trineo, se prepararon de acuerdo con el protocolo estándar y luego se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E). Las microfotografías se tomaron con un microscopio Olympus, CX31 equipado con una cámara Olympus U-CMAD3. A partir de las fotos se realizó un análisis comparativo de las estructuras siguiendo el atlas de histología para *Xenopus laevis* (Wiechmann, Wirsig-Wiechmann, & Wirsig-Wiechmann, 2003).

4.2.4 Atlas de anomalías

A partir de la información obtenida en los Capítulos 2 y 3 sobre las anomalías detectadas en larvas de anfibios por exposición a contaminantes ambientales y muestras de sedimentos provenientes de sitios con diferentes actividades antrópicas sumado a los resultados de este capítulo, se realizó una propuesta de nomenclatura unificada de las anomalías detectadas acompañada de una descripción, ponderando su importancia y relevancia al momento de evaluar factores de estrés.

4.2.5 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron de acuerdo con (Zar, 2013). El análisis de datos se realizó con el software R versión 3.1.1 (R Development Core Team, 2014). El nivel de significancia se estableció en 0,05 para todas las pruebas. Para todas las variables evaluadas se aplicó estadística descriptiva. Se calcularon índices ecológicos densidad, riqueza y abundancia y se determinaron las tasas de desarrollo de ambas especies para los diferentes sitios. Se calculó el índice de condición corporal (peso / longitud³) en todos los individuos y

el índice hepatosomático (peso del hígado/peso total) de los individuos que fueron disectados. Las larvas de los diferentes sitios fueron agrupadas en 6 categorías según el estadio de desarrollo ([25-27]; [28-30]; [31-33]; [34-36]; [37-39]; [40-42]) y se determinó si estas presentaban diferencias significativas en el peso, la longitud y los índices entre los sitios mediante ANOVA-Tukey. La normalidad y la homocedasticidad fue corroborada por las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett. Para las anomalías y la presencia de parásitos se calculó la frecuencia de ocurrencia y se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar diferencias significativas entre los sitios.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Sitios de estudio

Mediante los relevamientos realizados y descriptos en el Capítulo 1, se pudo detectar la presencia y reproducción de las especies de estudio en nueve de los sitios estudiados a saber: 2, 3 (referencia); sitios 4, 5, 7, 8 y 9 (problemática agrícola), sitio 19 (problemática industrial) y el sitio 21 (problemática de descargas cloacales).

Debido a que la reproducción de las especies de estudio se observó en pocos sitios de las problemáticas industrial y descargas cloacales y que no se pudo constatar la presencia y reproducción de las especies en los sitios seleccionados para la problemática urbana, se adicionaron 7 sitios en los cuales se constató la presencia de las especies de estudio a saber: sitios 22 y 23 (referencia), sitios 24, 25 y 26 (agrícola), sitio 27 (urbano) y sitio 28 (industrial). En la Tabla 1.3 (Capítulo 1) se listan los sitios nuevos, junto con sus coordenadas y en la Figura 1.1 (Capítulo 1) se puede observar su ubicación.

Los sitios nuevos que fueron tomados como referencia (Sitios 22 y 23), se seleccionaron con la intención de contar con más sitios de referencia y aumentar el tamaño de muestra, y la cantidad de información. El sitio 22 es una charca temporaria formada por agua de lluvia al costado de la ruta 20. El sitio 23 es una laguna ubicada en la reserva ecológica de Punta Lara.

Los sitios 24 y 25 que fueron incorporados a la problemática agrícola pertenecen a charcas temporarias que se forman en los márgenes del arroyo Carnaval cercanos a los sitios 5 y 8 respectivamente. Por otro lado, el sitio 26 corresponde a un arroyo que cruza con la ruta 36.

El sitio 27 incorporado a la problemática urbana, consiste en una charca temporaria de poca profundidad ubicado en las cercanías del arroyo Zanjón (S11), por otro lado, el sitio 28 incorporado a la problemática industrial, corresponde con una charca temporaria.

4.3.2 Muestreos

Se realizaron 34 muestreos en los sitios de estudio. En la Tabla 4.1 se muestran las problemáticas asociadas, los sitios, las especies y el número total de larvas colectadas.

Problemática	Sitio	Fecha	Especie	Estadio	N	
Referencia	2	20/10/2015	Ra	25	20	
		6/11/2016	Ra	38	32	
		4/8/2017	Bp	37	16	
	3	1/9/2017	Bp	25	28	
		20/9/2017	Bp	27	32	
		17/11/2018	Bp	32	28	
	22	6/11/2017	Bp	32	30	
	23	25/11/2017	Bp	33	30	
	Agrícola	4	26/5/2017	Bp	27	16
			2/9/2017	Bp	31	22
19/9/2017			Bp	33	30	
20/10/2017			Bp	26	29	
7/11/2017			Bp	28	17	
7		23/10/2016	Bp	32	15	
8		28/4/2017	Bp	25	33	
		22/5/2017	Bp	27	14	
		5/6/2017	Bp	25	8	
		23/8/2017	Bp	27	9	
		2/9/2017	Bp	35	15	
9		13/11/2017	Bp	25	42	
		8/7/2016	Bp	27	38	
	24	20/10/2015	Ra	25	1000	
1/11/2017		Ra	32	23		
25	1/10/2016	Ra	25	381		
	13/9/2017	Ra	27	64		
	11/12/2017	Ra	36	54		
26	23/8/2017	Bp	31	11		
Urbana	27	18/9/2017	Ra	26	43	
Industrial	19	23/10/2016	Ra	35	30	
		25/11/2016	Ra	J	8	
	28	1/11/2017	Ra	35	32	
		15/9/2017	Bp	28	11	
		7/11/2017	Bp	32	55	
Cloacas	21	28/11/2016	Ra	J	5	
		8/12/2016	Ra	J	10	

Tabla 4.1. Muestreos realizados en los sitios de estudio

La información recabada no permitió estimar algunos de los parámetros propuestos como ser los índices de diversidad, riqueza y abundancia.

4.3.3 Análisis de la Morfología larvaria

El total de larvas muestreadas y analizadas fue de 2.174 larvas de las cuales 592 corresponden a la especie *Boana pulchella* y 1682 a *Rhinella arenarum*. Los pesos, estadios de desarrollo y longitudes promedios de las larvas de ambas especies se puede observar en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2.- Longitud, peso y estadio de desarrollo promedio de las larvas de los diferentes sitios. *

R. arenarum

Problem.	Sitos	N	Peso (g)	LT(mm)	LCU (mm)	AC(mm)	STD
Referencia	2	20	0,07±0,1	10,25±2,35	4,66±0,82	2,5± 0,2	25±2
		32	0,28±0,5	29,36±2,34	12,31±0,92	7,24±0,71	38,56±2,97
Agrícola	24	1000	0,15±0,7	9,63±2,38	6,33±0,97	2,3±0,72	25±2,5
		23	0,09±0,05	16,58±4,90	7,30±2,1	4,87±1,2	31,61±1,92
	25	381	0,12±0,09	9,58±4,91	3,60±2,2	1,87±1,3	25±1,93
		81	0,14±0,10	18,66±7,45	8,50±3,40	5,07±2,11	32±6,2
Urbana	27	43	0,04±0,1	14,63±1,79	6,31±0,64	5,96±0,59	26±0,1
Industrial	19	85	0,18±0,12	20,38±6,17	9,66±2,68	6,19±2,03	35,02±3,35
Cloaca	21	15	1,57±0,59	24,09±3,83	24,09±3,83	13,25±2,54	juveniles

B. pulchella

Problem.	Sitio	N	Peso (g)	LT (mm)	LCU (mm)	AC (mm)	STD
Referencia	2	29	0,07±0,05	17,74±5,39	7,94±1,74	4,49±1,13	26,41±1,28
		3	0,2±0,28	20,66±11,08	8,62±4,04	5,28±2,10	28,37±5,02
		22	0,22±0,23	38,67±2,35	16,34±1,28	10,77±0,78	30,75±1,70
		23	0,68±0,46	23,55±4,02	9,18±1,44	6,68±2,41	32,33±3,14
Agrícola	4	114	0,37±0,30	29,77±13,20	10,74±4,19	6,45±2,43	30,05±3,65
		7	0,57±0,42	17,46±6,41	6,48±2,67	3,82±1,44	31,41±5,74
	8	128	0,17±0,35	16,01±14,49	6,23±4,84	3,86±3,09	27,15±2,35
		9	0,38±0,24	32,5±7,91	12,04±2,50	7,76±1,75	27,25±2,35
	24	30	0,59±0,53	30,19±11,65	12,4±2,77	7,76±2,99	32,7±5,16
		25	0,55±0,28	35,73±6,91	13,57±2,43	8,45±1,44	32,71±2,49
	26	11	0,16±0,05	25,93±4,15	9,54±0,86	5,92±0,75	26,54±1,50
		Industrial	28	0,52±0,41	34,05±11,30	12,84±3,68	7,96±2,03

*N: número de individuos, LT: Longitud total, LCU: longitud del cuerpo, AC: Ancho del cuerpo, STD: Estadio de desarrollo (Gosner 1960). Se muestra el promedio para cada sitio más menos el desvío estándar.

El análisis comparativo entre sitios, empleando los puntos finales crecimiento y estadio de desarrollo permitió detectar inhibición significativa del crecimiento en larvas de *B. pulchella* provenientes del sitio 8 (agrícola) para los estadios 25/27 [F (9,282): 48,613 p<0,05]. En el caso de las larvas de *R. arenarum* presentaron inhibición significativa del crecimiento las larvas provenientes de los sitios 24 y 25 (agrícola) [F (4,1466): 905,80 p<0,01].

Anormalidades externas

La prevalencia de individuos anormales de *B. pulchella* presentes en la totalidad de los sitios fue de 12,6 %, es decir que un total de 73 individuos de esta especie presentaron anomalías externas.

Para esta especie, en los sitios de referencia la prevalencia de individuos anormales fue de 2,5% este porcentaje está por debajo de los niveles basales propuestos por Read (1997). Para el resto de los sitios de estudio las prevalencias de individuos anormales se mantuvieron por debajo de los niveles basales a excepción de los sitios 4 (18%), 7 (41%) de la problemática agrícola y el sitio 28 (99%) de la problemática industrial.

Se identificaron 5 tipos de anomalías, las que se presentan a continuación en orden decreciente de acuerdo al número de individuos con sus respectivas prevalencias: Hiperpigmentación en cuerpo y cola (66 individuos: 11,9%), Alteraciones en la cola (7 individuos: 1,26%), Intestinos desplazados (3 individuos: 0,52%), anomalías orales (1 individuo: 0,1%), cuerpo hinchado (1 individuo: 0,1%).

El análisis para detectar diferencias significativas en la presencia de los diferentes tipos de anomalías entre los sitios permitió identificar en el sitio 28 de la problemática industrial una frecuencia de ocurrencia de individuos con hiper pigmentación significativamente mayor a la registrada para las larvas provenientes de los sitios de referencia [H (9,529) 528, p<0,001]. Además de esta anomalía, en este sitio se detectaron 4 individuos (6%) con anomalías en la aleta caudal (flexiones, curvas, daños en la aleta y la musculatura y colas más cortas) y dos individuos (3%) con el intestino desplazado hacia la región dorsal del cuerpo.

Para el resto de los sitios estudiados, los resultados de los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en la ocurrencia de anomalías con respecto del sitio de referencia. Aun así, cabe resaltar que en la problemática agrícola se registró la presencia de un individuo con edema general e intestino reducido, un individuo con alteraciones en la boca, un individuo con daño en la musculatura de la cola. En la Tabla 4.3 se muestran las

prevalencias de cada tipo de anomalía registradas en cada sitio. En la Figura 4.3 se pueden observar las anomalías detectadas.

Tabla 4.3- Prevalencias de cada tipo de anomalía registradas para *B.pulchella* pertenecientes a los sitios de estudio. *

Anormalidades	Referencia		Agrícola		Industrial	
	2	4	7	8	9	28
Orales				0,008		
Cola		0,18		0,008	0,025	0,03
Intestino desplazado	0,025		0,41	0,008		0,061
Hiperpigmentación						0,99*
Cuerpo hinchado			0,41	0,008		

Prevalencia: N° de individuos con anormales por sitio /N° total de individuos por sitio. ** Diferencias significativas en la prevalencia de las anomalías.

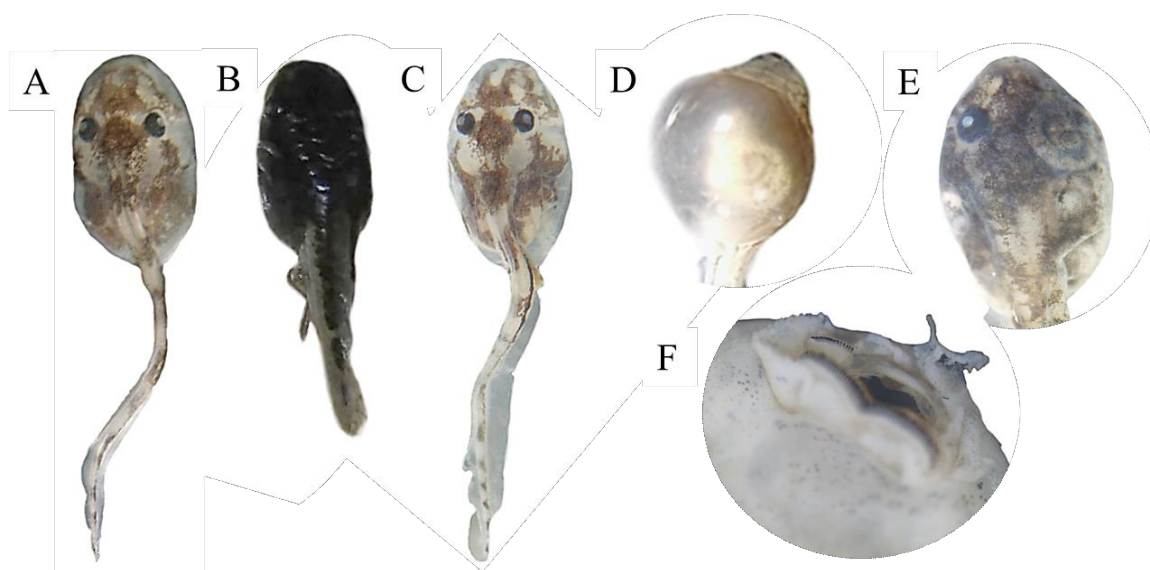


Figura 4.3. Anomalías externas detectadas en larvas de *Boana pulchella*. A- Curvatura de la cola- B- Hiperpigmentación - C Flexión de la cola- D Edema e intestino reducido- E- Intestino desplazado dorsalmente- F- Boca deforme.

La prevalencia de individuos anormales de *Rhinella arenarum* presentes en la totalidad de los sitios fue de 43,2 %, es decir que un total de 718 individuos de esta especie presentaron anomalías externas.

Para esta especie, en los sitios de referencia la prevalencia de individuos anormales fue de 1,4% este porcentaje se encuentra por debajo de los niveles basales propuestos por Read (1997). A excepción de los sitios 21 y 27 en los cuales no se registró la presencia de

anormalidades en el resto de los sitios de estudio las prevalencias de individuos anormales excedieron ampliamente los niveles basales estos fueron: Sitio 24 (63,5%), Sitio 25 (9,5%), Sitio 19 (34,2%).

Se identificaron 5 tipos de anormalidades las cuales se hallaron en la siguiente cantidad de individuos con sus respectivas prevalencias, en orden decreciente: Hinchazón abdominal (664 individuos: 35,8%), Flexiones de la cola (324 individuos: 19,4%), Falta de Queratodontes (21 individuos: 13,7%), Intestinos desplazados (4 individuo: 0,023%), miembros anormales (2 individuos: 0,1 %).

El análisis para detectar diferencias significativas en la presencia de los diferentes tipos de anormalidades entre los sitios permitió identificar en el sitio 19 de la problemática industrial una frecuencia de ocurrencia de individuos con ausencia de queratodontes significativamente mayor a la registrada para las larvas provenientes de los sitios de referencia (H [5,1682] 39,67, $p < 0,001$). Además de esta anormalidad, en este sitio se detectaron tres individuos con flexiones en la cola (4,2 %), dos individuos con anormalidades en los miembros (2%) y un individuo con intestinos desplazados (1,4%) (Figura 4.4). En los sitios 24 y 25 de la problemática agrícola se identificó una frecuencia de ocurrencia de individuos con flexiones de cola e hinchazón abdominal significativamente mayor a la registrada para las larvas provenientes de los sitios de referencia [H (5,1682) 13,92, $p < 0,001$], [H (5,1682) 13,86, $p < 0,001$].

Para el resto de los sitios estudiados, los resultados de los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en la ocurrencia de anormalidades con respecto del sitio de referencia. En la Tabla 4.4 se muestran las prevalencias de cada tipo de anormalidad registradas en cada sitio. En la Figura 4.4 se pueden observar las anormalidades detectadas.

Tabla 4.4- Prevalencias de cada tipo de anormalidad registrada para *R.arenarum*, pertenecientes a los sitios de estudio. *

Anormalidades	Referencia	Agrícola		Industrial
	1	24	25	19
Ausencia de Queratodontes	0,014			0,27*
Flexión de la cola		0,29*	0,053*	0,04
Intestino desplazado				0,014
Hinchazón abdominal		0,63*	0,052*	
Miembros deformes				0,024

** Diferencias significativas en la prevalencia de cada anormalidad.

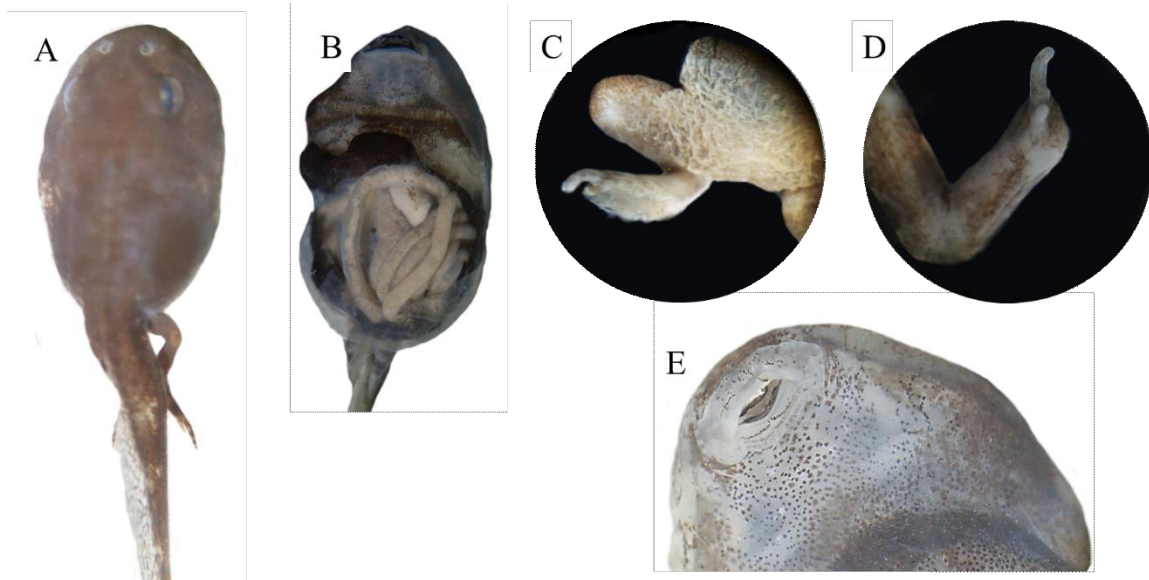


Figura 4.4. Anormalidades externas detectadas en larvas de *Rhinella arenarum*. A- Flexión de la cola- B- Intestino desplazado- C Miembro posterior derecho anormal- D Miembro anterior izquierdo anormal- E- Ausencia de queratodontes.

A partir del hallazgo de las altas ocurrencias de individuos anormales presentes en los sitios 24 y 25 de la problemática agrícola se decidió a profundizar el estudio de esta anomalía mediante disección y estudios histopatológicos.

El evento particular que dio como consecuencia una alta presencia de anomalías se repitió en dos años consecutivos. Durante la prospección del sitio (y a simple vista) se observó la presencia de una gran cantidad de embriones y larvas dispuestos sobre la superficie del agua, los mismos presentaban un comportamiento anormal y llamativo, y aparentemente a primera vista presentaban anomalías morfológicas.

Los resultados del análisis de anomalías mostraron que del total de los individuos analizados 321 presentaron severa flexión lateral de la cola (21%) y 654 individuos presentaron la región abdominal con diferentes grados de hinchazón (43%) (Figura 4.5). La hinchazón del cuerpo provocaba que las larvas flotaran, y no pudieran sumergirse ni nadar normalmente.

La observación bajo microscopio estereoscópico permitió identificar diferentes grados de severidad de la anomalía registrada como hinchazón abdominal. Estos grados de severidad permitieron describir de manera progresiva la expresión del efecto, desde sus etapas iniciales hasta su estadio final establecido como la muerte de los individuos.

El número de individuos que presentaron los diferentes estados de la anomalía hinchazón abdominal y sus respectivos porcentajes fueron: 1- 143 individuos (21,5%) 2- 43 Individuos

(6,47%), 3- 113 individuos (17.02%), 4- 168 individuos (25.30%), 5-197 individuos (29.66%).

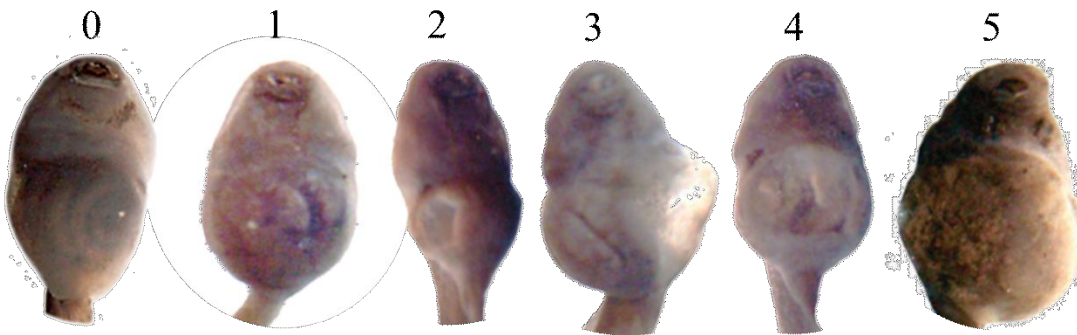


Figura4.5- Anormalidades presentes en larvas de *Rhinella arenarum*.. - 0- Larva Normal. 1- Individuo con grado de severidad 1; 2- Individuo con grado de severidad 2; 3- Individuo con grado de severidad 3; 4 Individuo con grado de severidad 4; 5- Individuo con grado de severidad 5.

Asociado con la relevancia del hallazgo se decidió profundizar el estudio de esta anomalía mediante disección y estudios histopatológicos.

El análisis anatómico e histopatológico de las anomalías de las larvas con hinchazón abdominal aportó evidencias que sustentan la hipótesis de la progresión de efectos que comienza con un efecto a nivel de la natación y terminan con lesiones graves, significativas y desencadenan en la muerte de los individuos. En la Figura 4.6 se muestran los intestinos de los individuos en las diferentes etapas progresivas de la anomalía y los cortes histológicos asociados y en la Figura 4.7 se muestra los cortes histológicos a mayor aumento.

Los resultados fueron clasificados en 5 categorías a saber:

0- Individuos normales sin hinchazón abdominal. Intestino con estructura en espiral, tamaño y disposición normal. El corte histológico muestra estructuras normales.

1-Individuos con una leve hinchazón abdominal. Intestino con estructura en espiral normal, con asas intestinales engrosadas. El corte histológico muestra que los órganos se mantienen en una posición normal, aunque se hace evidente un leve agrandamiento de las asas intestinales y del estómago con algo de contenido en ambos órganos.

2-Individuos con una moderada hinchazón en el lado derecho de la región abdominal con contenido que desplaza al intestino. Intestino con una leve deformación de la estructura en espiral y asas engrosadas. El corte histológico muestra la pared del tubo digestivo hipertrofiada con una intensa hemorragia en el estómago y en algunas asas intestinales, hay desplazamiento de estas últimas, haciendo que el corte transversal del cuerpo se vea oval.

3-Individuos con hinchazón abdominal moderada que desplaza a las asas intestinales hacia un flanco. Intestino con leve deformación de estructura en espiral y desplazadas, asas intestinales engrosadas. En el corte histológico no se diferencia estómago de intestino debido a que la pared del tubo digestivo se adelgaza y se pierden las vellosidades y pliegues característicos de cada órgano. Todo el tubo digestivo está repleto de comida.

4-Individuos con hinchazón abdominal severa que desplaza a las asas. El intestino pierde la estructura en espiral y presenta asas engrosadas. En el corte histológico se observan las mismas características que las descritas para el grado 3 sumado a la observación de un espacio que queda entre las asas y la pared del cuerpo.

5-Individuos con hinchazón abdominal severa que lleva a la ruptura de las paredes intestinales, pérdida de la estructura en espiral del intestino. Se observa además contenido digestivo dentro de la cavidad. En el corte histológico se observa una pérdida total de la arquitectura de los órganos, con ruptura de las paredes del tubo digestivo con una gran descamación celular.

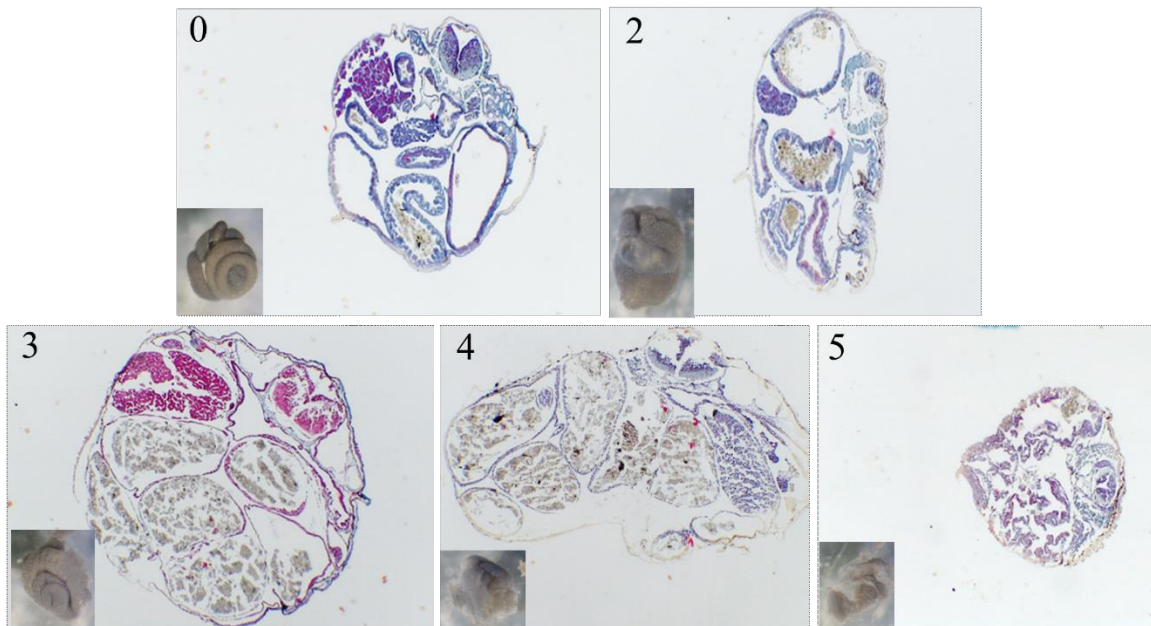


Figura 4.5- Intestinos y cortes histológicos de las anomalías presentes en larvas de *Rhinella arenarum*. Enumeradas según el grado de severidad de la anomalía.

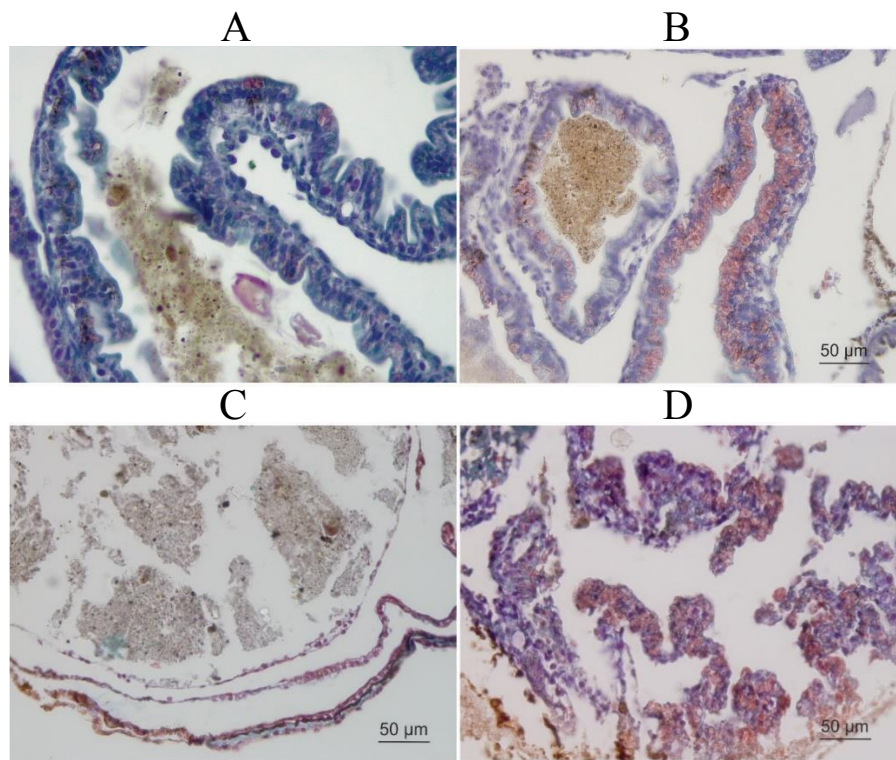


Figura 4.6- Cortes histológicos de las anomalías presentes en larvas de *Rhinella arenarum*. A- Intestino normal. B- Intestino con anomalía de grado 2: Intensa hemorragia en el estómago y en algunas asas intestinales. C- Intestino con anomalía de grado 3/4 con un adelgazamiento de la pared intestinal. D- Intestino con anomalía de grado 5 con ruptura de las paredes del tubo digestivo, descamación celular y hemorragia.

Estos resultados permitieron evidenciar que, en los sitios pertenecientes a la problemática agrícola, ocurren episodios de contaminación aguda, los cuales provocan efectos devastadores que no solo provocan anomalías en las larvas, sino que posteriormente devienen en la muerte de los individuos. Además, las frecuencias de ocurrencia de estas anomalías fueron altísimas lo cual tiene implicancias a nivel poblacional, si consideramos que *R. arenarum* se reproduce solo una vez al año y que luego de un evento reproductivo exitoso las larvas no sobreviven, los efectos se verán reflejados en las poblaciones que se reproducen en ese lugar.

La prevalencia de individuos con parásitos en la piel, tanto del cuerpo como de la cola de los individuos de ambas especies en los sitios de referencia fueron del 0,01% para *R. arenarum* y del 3% para *Boana pulchella* (Figura 4.8 A y B). En lo que respecta a los sitios contaminados ambas especies la prevalencia de individuos con parásitos externos fueron similares a las registradas para los sitios de referencia no encontrándose diferencias significativas.

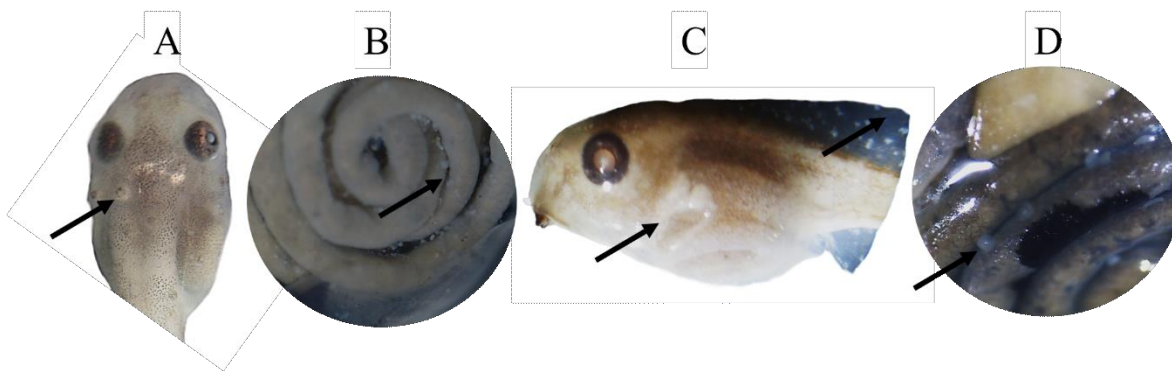


Figura 4.8. Parásitos externos e internos. A-B En *Boana pulchella* . C-D En *Rhinella arenarum*

Los resultados de los análisis del índice hepatosomático evidenciaron que las larvas de *Boana pulchella* provenientes de la problemática agrícola (sitio 8) y de la problemática industrial (sitio 28) presentaban un índice hepatosomático significativamente mayor que las larvas de los sitios de referencia [F (7, 90) =8,5034, $p < 0,001$]. Por otro lado, las larvas de *Rhinella arenarum* no presentaron diferencias significativas en el índice hepatosomático al comparar los diferentes sitios con el sitio de referencia.

En los sitios de referencia la prevalencia de individuos con anomalías internas fue de 10% (1 individuo) para *B. pulchella* y del 90% (10 individuos) para las larvas de *R. arenarum*.

Las anomalías internas encontradas y consideradas como relevantes ocurrieron en los siguientes órganos:

Vesículas biliares: Estas presentaban contenido interno en forma de gránulos dispersos de variados tamaños, en algunos casos se observó además variaciones en la coloración de la bilis que podía variar de amarillo a verdoso.

Hígado: Estos presentaban puntos negros de tamaño similar dispersos uniformemente.

Pulmón: Se observó un menor desarrollo (hipotrofia) de uno de los pulmones.

Riñón: Se observaron dos tipos de anomalías: 1-presencia de una coloración rojiza en el centro del riñón que irradia hacia el extremo considerado una hemorragia. 2-presencia de edema en la región anterior del riñón izquierdo.

Cuerpos grasos: Los cuales presentaban una coloración blanquecina (Hipo pigmentación).

En cuanto a la ocurrencia de anomalías detectadas para la totalidad de los individuos analizados, para la especie *Boana pulchella* se identificaron 25 individuos anormales (27%).

Estas anomalías fueron detectadas en los siguientes órganos y con las siguientes prevalencias: vesículas biliares (11 individuos: 12,2%), hígado (3 individuos: 3,3%), pulmón

(4 individuos: 4,4%), Riñón (1 individuo: 1,1%) y cuerpos grasos (10 individuos: 11,1%). (Figura 4.9).

Al analizar la presencia de anomalías internas en función de los sitios estudiados se pudo determinar que las larvas del sitio 7 correspondiente a la problemática agrícola presentaron una frecuencia significativamente mayor de vesículas con contenido interno [H (7, 94) = 40,78950 p <0,005] y las larvas del sitio 28 correspondiente a la problemática industrial presentaron frecuencias significativamente mayores de cuerpos grasos hipopigmentados e hígados con puntos negros [H (7,94) =93,0 p <0,001] ; [(7, 94) =25,75 p =,0006].

Si bien las frecuencias de ocurrencia para el resto de las anomalías no presentaron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico respecto del sitio de referencia se presentan a continuación los registros de las anomalías consideradas relevantes para este estudio: En el sitio 28 (industrial) se detectó un individuo (10%) con hemorragia en el riñón y en los sitios 4 y 8 (agrícola) se encontraron 4 individuos con pulmones menos desarrollados (40%). Dichas evidencias son relevantes desde el punto de vista biológico, ya que son anomalías graves que pueden devenir en la muerte de los individuos, lo que hace que el hallazgo de un número significativo de individuos con estas anomalías resulte difícil. En la Tabla 4.5 se presentan las prevalencias para cada una de las anomalías registradas.

Tabla 4.5- Prevalencias de cada tipo de anomalía registradas en los órganos internos para *B.pulchella* pertenecientes a los sitios de estudio. *

Anormalidades	Referencia		Agrícola		Industrial	
	3	4	7	8	9	28
Vesícula biliar	0,1	0,3	0,5*		0,1	
Hígado						0,5*
Pulmón		0,2		0,2		
Cuerpos grasos						0,9*

** Diferencias significativas en la prevalencia de cada anomalía.

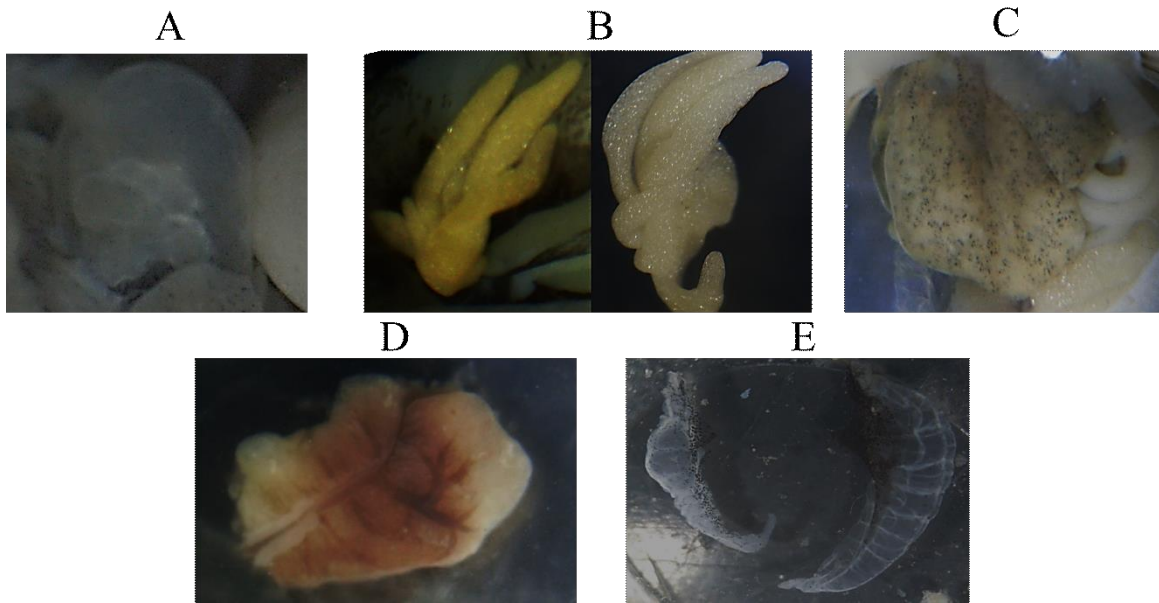


Figura 4.9 Anormalidades internas presentes en larvas de *Boana pulchella*. A- Vesículas biliares con contenido. B Cuerpos grasos hipopigmentados (derecha) y normales (izquierda)- C Hígado con puntos negros- D Riñón con hemorragia- E pulmón derecho menos desarrollado.

En cuanto a la ocurrencia de anomalías internas detectadas para la totalidad de los individuos analizados, para la especie *Rhinella arenarum* se identificaron 25 individuos anormales (52%).

Estas anomalías fueron detectadas en los siguientes órganos y con las siguientes prevalencias: vesículas biliares (13 individuos: 26%), riñones (3 individuos: 3%) e hígado (2 individuos: 4%) (Figura 4.10).

Al analizar la presencia de anomalías internas en función de los sitios estudiados se pudo determinar que las larvas del sitio 2 de referencia presentaron una frecuencia significativamente mayor de vesículas biliares con contenido [$H(4,50) = 86,0$ $p < 0,001$].

Si bien las frecuencias de ocurrencia para el resto de las anomalías no presentaron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico respecto del sitio de referencia se presentan a continuación los registros de las anomalías consideradas relevantes para este estudio: En el sitio 25 (agrícola) se identificaron dos individuos con puntos negros en el hígado (20%) y un individuo con edemas en el riñón (10%), dichas anomalías se consideran biológicamente importantes ya que pueden devenir en la muerte de los individuos. En la Tabla 4.6 se presentan las prevalencias de estas anomalías.

Tabla 4.6- Prevalencias de cada tipo de anomalía registradas en los órganos internos para *R. arenarum* pertenecientes a los sitios de estudio. *

	Referencia	Agrícola		Industrial
Anormalidades	1	24	25	19
Vesícula biliar	0,9*	0,1	-	0,2
Hígado	0,1		0,1	-
Riñón	-	0,1	0,1	-

** Diferencias significativas en la prevalencia de cada anomalía

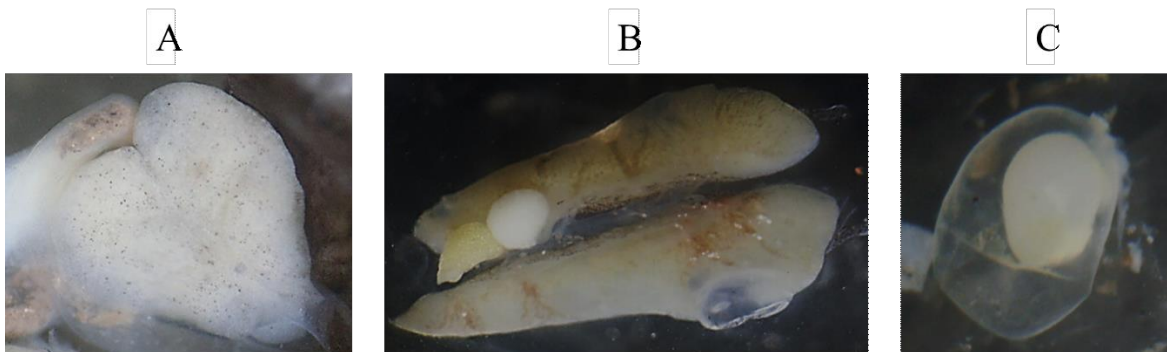


Figura 4.10. Anormalidades internas presentes en larvas de *Rhinella arenarum*. A Hígado con puntos negros. B- Riñón con edema C- Vesículas biliares con contenido.

Las prevalencias de individuos con parásitos internos para ambas especies en los sitios de referencia fueron del 0% para *R. arenarum* y del 30% para *B. pulchella*.

En *B. pulchella* el 28, 88% del total de los individuos diseccionados presentaron parásitos. La frecuencia de parásitos fue significativamente mayor en los individuos de la problemática industrial (sitio 28) [$H(7,94) = 40,74$ $p < 0,05$]. En el caso de las larvas de *R. arenarum* el 12% del total de los individuos diseccionados presentó parásitos, pero estos valores no resultaron ser significativos para ningún sitio en particular (Figura 4.6).

Los resultados relacionados con la anatomía interna (musculatura y condrocraqueo) permitieron determinar que el desarrollo de los músculos del aparato mandibular y el condrocraqueo resultaron normales para los individuos analizados de ambas especies a excepción de un individuo de *B. pulchella* proveniente del sitio 4 de la problemática agrícola,

el cual presentó un músculo extra entre los músculos Intermandibularis posterior, Interhyoideus, Hyoangularis y Geniohyoideus (Figura 4.9).

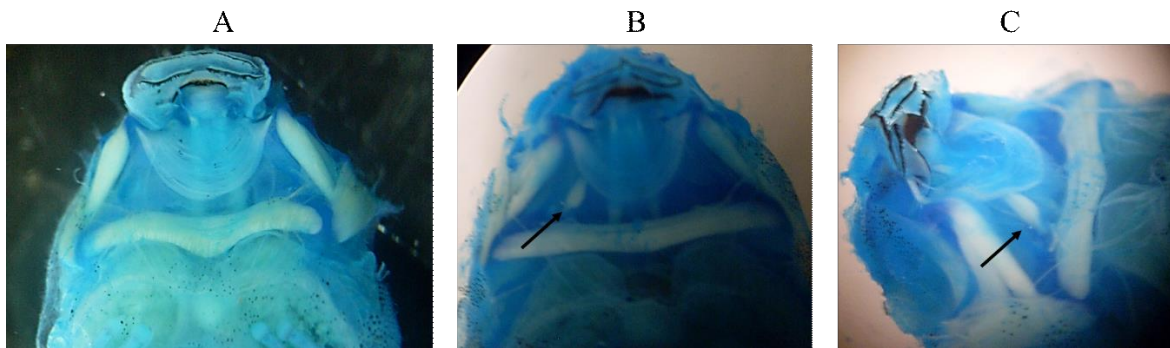


Figura 4.11- Músculos mandibulares- A- vista ventral normal. B- Vista ventral con presencia de músculo extra (flecha) C- Vista lateral con presencia de músculo extra (flecha).

4.3.4 Integración e Inferencia de la calidad ambiental

El resultado del análisis de las larvas provenientes de los sitios de estudio permitió detectar alteraciones significativas y relevantes en 7 de los sitios estudiados, de los cuales 5 corresponden a la problemática agrícola y 2 a la problemática industrial.

Mediante el análisis de la morfología externa de las larvas de campo se logró evidenciar efectos en el crecimiento, frecuencias significativamente altas de individuos anormales, así como también de presencia de parásitos. Por otro lado, el análisis de la morfología interna permitió detectar anomalías en los órganos internos de las larvas y profundizar en la descripción de algunas de las anomalías externas.

En cuanto a las zonas de estudio, el sitio 28 de la problemática industrial presentó larvas con prevalencias significativas de anomalías tanto externas como internas y presencia de parásitos internos, además de presentar mayor índice hepatosomático. Al comparar estos resultados con los obtenidos mediante los bioensayos con sedimento podemos observar que, tal como se explicó al comienzo del capítulo, en solo dos de los sitios pertenecientes a esta problemática se pudieron hallar larvas de las especies de estudio, estos resultados se corresponden con los altos porcentajes de mortalidad observados en los bioensayos. Por otro lado, las anomalías halladas en las larvas de este sitio fueron detectadas en los bioensayos con sedimentos, en particular la ausencia de pico corneo resultó significativa en varios bioensayos, así como también en las larvas de campo, esto sumado a las anomalías internas detectadas, a la presencia de un índice hepatosomático mayor y la presencia de parásitos detectadas en esta larvas puede dar indicios de que las poblaciones de anuros de este sitio se encuentran en peligro y que posiblemente este sitio deje de ser un sitio reproductivo al igual que lo observado para el resto de los sitios seleccionados para esta problemática.

En los sitios 24 y 25 de la problemática agrícola se detectaron larvas con inhibición del crecimiento, anormalidades internas y gran cantidad de anormalidades externas. Por otro lado, en el sitio 8 de esta misma problemática se encontraron larvas con inhibición del crecimiento y mayor índice hepatosomático. Al comprar estos resultados con los obtenidos mediante los bioensayos con sedimento podemos observar que los porcentajes de mortalidad de las larvas expuestas a sedimentos de estos sitios estuvieron alrededor del 60% y en el campo las larvas fueron halladas en la mayoría de los sitios correspondientes de esta problemática. Por otro lado, a pesar de que las especies de estudio utilizan estos sitios como sitios reproductivos pudimos observar alteraciones en las larvas de ambas especies. La inhibición del crecimiento observada en larvas de campo para ambas especies, también fue evidenciada en los bioensayos con sedimentos de estos sitios, y en particular los efectos se vieron en larvas en estadio 25/27. Las presencias de anormalidades externas halladas en larvas de campo también se registraron en las larvas expuestas, en particular la presencia de individuos con cuerpos hinchados fue registrada solo para esta problemática tanto en larvas de campo como en las expuestas. Cabe resaltar que en estos sitios se evidenciaron episodios de contaminación aguda, con presencia de un gran número de larvas anormales, y como se indicó oportunamente este tipo de eventos que provocan altas anormalidades y muerte a las larvas tiene consecuencias a nivel poblacional, en los anuros que se reproducen en ese lugar.

4.3.5 Nomenclatura unificada de Anormalidades

A partir de la información obtenida de las anormalidades registradas en los ensayos con sedimentos (Capítulo 3) y las anormalidades detectadas en el campo, se presenta una propuesta de nomenclatura unificada acompañada de una descripción de las anormalidades registradas, ponderando su importancia y relevancia al momento de evaluar factores de estrés (en particular contaminantes ambientales) sobre larvas con la correspondiente justificación de exclusión para aquellas que no consideramos relevantes en un contexto ecotoxicológico.

-Flexión de la cola: Es una pronunciada flexión que se genera desde la base de la cola desplazando la misma respecto al plano sagital de su eje, tanto hacia los laterales como en sentido dorsal-ventral. Esta anomalía fue descrita por Bantle (1996): “*severe lateral flexure of the tail and dorsal flexure of the tail*”. Se trata de una anomalía severa que está frecuentemente asociada con anomalías en el desarrollo de la notocorda o “giro notocordal” inducido por LATHYOGENS (componentes que alteran el desarrollo normal en tejidos conectivo, cartílago y hueso). Esta anomalía provoca en las larvas problemas en la natación que le impiden desplazarse normalmente, es muy probable que en la naturaleza las larvas que sufren esta anomalía sean más susceptibles a ser atacadas por depredadores. En el desarrollo del presente trabajo de tesis se ha observado



que, luego de la metamorfosis los individuos que presentaban este tipo de anomalía pueden tener desviaciones de la columna a nivel del urostilo (escoliosis) y dependiendo del grado de desviación, los individuos pueden desplazarse normalmente o con una mínima dificultad. Al analizar las anomalías provocadas por exposición a contaminantes (Capítulo 2) se asoció esta anomalía con la exposición a Glifosato y Cobre, por otro lado al evaluar la toxicidad de sedimentos provenientes de sitios con diferentes usos del suelo (Capítulo 3) se observó que esta anomalía ocurre con frecuencias significativas en larvas expuestas a muestras de las problemáticas agrícolas, urbanas e industriales, por último al evaluar la presencia de esta anomalía en larvas provenientes de los sitios estudiados (Capítulo 4) se determinó la presencia de la misma en larvas provenientes de las problemáticas agrícolas e industrial. En lo que respecta a la bibliografía ecotoxicológica consultada, esta anomalía fue reportada por numerosos trabajos realizados en laboratorio mediante la exposición de larvas o embriones a metales (Chen, Gross, & Karasov, 2006; Luo, Plowman, Hopfer, & Sunderman, 1993; Unrine & Jagoe, 2004), Plaguicidas (Agostini, Natale, & Ronco, 2010; Allran & Karasov, 2000; Aronzon, Marino, Ronco, & Pérez Coll, 2014; Aronzon, Sandoval, Herkovits, & Pérez-Coll, 2011; Brunelli *et al.*, 2009; Cooke, 1972, 1981; Devi & Gupta, 2013; Harris, Chora, Bishop, & Bogart, 2000; Harris, Bishop, Struger, Ripley, & Bogart, 1998; Lascano, Sotomayor, Ferrari, & Venturino, 2009; Liendro, Ferrari, Mardirosian, Lascano, & Venturino, 2015; Natale *et al.*, 2018; Osano, Admiraal, & Otieno, 2002; Ruiz de Arcaute, Salgado Costa, Demetrio, Natale, & Ronco, 2012; Sansiñena *et al.*, 2018; Svartz, Herkovits, & Pérez-Coll, 2012; Svartz & Pérez-Coll, 2013; Svartz, Wolkowicz, & Coll, 2014), fluoruro (Zhang *et al.*, 2018), radiación Uv (Romansic, Waggener, Bancroft, & Blaustein, 2009) y epiclohidrina (Wolkowicz, Aronzon, & Perez-Coll, 2013). Esta anomalía no fue reportada en trabajos a campo.

-Curvatura de la cola: A diferencia de la flexión, la curvatura es una desviación curva de la cola que se genera en dirección lateral o dorso- ventral de manera más pronunciada en la región central de la cola. Esta anomalía puede deberse a un defecto en la somitogénesis (partición del mesoderma presomítico en somitos, que experimentan una rotación de 90 °) o la rotación incompleta de somitas (Severtsova *et al.*, 2012). Esta anomalía provoca problemas en la natación que, al igual que la flexión, ponen en peligro la supervivencia de los individuos. En el desarrollo de esta tesis se ha observado que durante la anestesia las larvas adoptan posiciones de la cola (de forma curvada) que prevalecen luego de la fijación, por lo tanto, esta posición puede ser confundida con la anomalía de curvatura de la cola. Para realizar un buen diagnóstico se recomienda evaluar la posición de la cola, así como la natación de los individuos previamente a la anestesia. Al analizar las anomalías provocadas por exposición a contaminantes (Capítulo 2) se asoció esta anomalía con la exposición a Glifosato y, por otro lado, al evaluar la toxicidad de sedimentos (Capítulo 3) y larvas provenientes de los sitios estudiados (Capítulo 4) no se



detectaron larvas con este tipo de anomalía que pudieran ser adjudicadas a las problemáticas estudiadas. En lo que respecta a la bibliografía ecotoxicológica consultada, esta anomalía fue reportada en estudios de laboratorio mediante la exposición de larvas a metales (Abbasi & Soni, 1984; Aguilón-Gutiérrez & Ramírez-Bautista, 2015; Park, Song, Kim, & Gye, 2017; Plowman, Grbac-Ivankovic, Martin, Hopfer, & Sunderman Jr, 1994; Quintero & De Dulce, 1996; Severtsova *et al.*, 2012) y Plaguicidas (Cooke, 1972, 1981; Lajmanovich, Sandoval, & Peltzer, 2003; Lenkowski, Reed, Deininger, & McLaughlin, 2008; Mussi & Calcaterra, 2010; Quintaneiro, Soares, & Monteiro, 2018; Sotomayor, Lascano, de D'Angelo, & Venturino, 2012; Svartz *et al.*, 2012; G. Svartz, Aronzon, & Perez-Coll, 2016). Esta anomalía no fue reportada en trabajos a campo.

-Ondulación de la cola: Es una ondulación del eje axial de la cola, la cual puede darse

dorsoventralmente o lateralmente. El número de pliegues u ondulaciones puede variar. Esta anomalía fue descrita por Bantle (1996) como: “Wavy Tail o Severe Wavy Tail”. Esta anomalía, dependiendo del grado de ondulación presentada en la cola, puede provocar problemas en la natación de los



individuos, haciéndolos más susceptibles a ser capturados por depredadores. El origen de esta anomalía no está descrito. En el desarrollo de la tesis se han observado pocos individuos que presentan este tipo de anomalía por lo que no se ha podido asociar a ningún contaminante ni problemática evaluada. En lo que respecta a la bibliografía ecotoxicológica consultada, esta anomalía fue reportada en estudios de laboratorio mediante la exposición de larvas a metales (Haywood, Alexander, Byrne, & Cukrowska, 2004) y plaguicidas (Allran & Karasov, 2000; Aronzon *et al.*, 2014; Aronzon *et al.*, 2011; Svartz *et al.*, 2012). Además, esta anomalía fue reportada en un trabajo realizado en campo (Hopkins, Congdon, & Ray, 2000).

-Pliegue de la cola: Se da cuando la cola se doblada o pliega lateralmente formando un

ángulo Esta anomalía fue descrita por Cook (1972) como: “Lateral kink at base of tail” Esta anomalía dependiendo del grado de pliegue puede preobocar alteraciones en la natación y consecuentemente en la búsqueda de alimento. El origen de esta anomalía no está descrito. En el desarrollo de la tesis se ha observado pocos individuos que presentan este tipo de anomalía por lo que no se ha podido asociar a ningún



contaminante ni problemática evaluada. En lo que respecta a la bibliografía ecotoxicológica consultada, esta anomalía fue reportada en estudios de laboratorio mediante la exposición a plaguicidas (Cooke, 1972, 1981; Greulich & Pflugmacher, 2003; Liendro *et al.*, 2015). En la bibliografía consultada, esta anomalía fue denominada por otros autores como:

curvatura, ondulación y “Twist” (Aronzon *et al.*, 2011; Hopkins *et al.*, 2000; Liendro *et al.*, 2015).

-Cuerpo cóncavo ventralmente: El cuerpo de los individuos presenta una concavidad ventral evidente, se observa la curvatura de la notocorda a nivel del cuerpo. En la presente tesis se observó esta anomalía en individuos que no ingerían alimento (a causa de los tratamientos) y su intestino experimentaba una regresión en extremo causando el desplazamiento de las paredes corporales y generando la forma típica de las larvas cóncavas ventralmente. Las larvas que presentan esta anomalía no se alimentan normalmente por lo que no sobreviven muchos días en estas condiciones. Al evaluar la toxicidad de sedimentos provenientes de sitios con diferentes usos del suelo (Capítulo 3) se observó que esta anomalía ocurre con frecuencias significativas en larvas expuestas a muestras provenientes de las problemáticas urbana y de descargas cloacales. En la bibliografía consultada no se encontraron trabajos que reporten este tipo de anomalía.



-Cuerpo asimétrico: Desarrollo mayor o menor de alguna región del cuerpo que causa asimetría y la pérdida de bilateralidad en el individuo afectado. Esta anomalía puede estar dada por alteraciones en la cascada de expresión que establece el eje embrionario izquierdo- derecho. En las larvas que presentaron este tipo de anomalía no se observó ningún comportamiento anormal, las mismas se desplazaban y alimentaban con normalidad. Aun así se desconoce si dichas larvas pueden llegar a superar el clímax metamórfico. En el desarrollo de la tesis se ha observado pocos individuos que presentan este tipo de anomalía por lo que no se ha podido asociar a ningún contaminante ni problemática evaluada. En lo que respecta a la bibliografía ecotoxicológica consultada, esta anomalía fue reportada por (Rosenshield, Jofré, & Karasov, 1999) en larvas expuestas desde embriones a PCB.



-Intestino desplazado: Enrollamiento anormal de las asas del intestino que causa la alteración de la forma espiral típica, ya sea por desplazamiento de la posición normal o por un mal enrollamiento. Esta anomalía fue descrita por Bantle (1996) como “Incomplete Coiling”. En un estudio de manipulación experimental de eventos embriológicos tempranos demostraron que el agotamiento parcial del ARNm de Pitx2c (factor de transcripción homeobox que desempeña un importante papel durante la morfogénesis embrionaria y en el mantenimiento del músculo esquelético) en embriones de *Xenopus sp* resulta en una alteración tanto de la morfología cardíaca como del enrollamiento intestinal.



La gravedad de esta anomalía depende del grado de desplazamiento y enrollamiento del intestino. En este trabajo de tesis se han observado individuos con un grado de desplazamiento menor, los cuales tenían comportamientos normales, así como individuos con desplazamientos graves de intestino que generalmente se asoció a una reducción en el tamaño del mismo. Al evaluar la toxicidad de sedimentos provenientes de sitios con diferentes usos del suelo (Capítulo 3) se observó que esta anomalía ocurre con frecuencias significativas en larvas expuestas a muestras de las problemáticas agrícola, urbana e industrial. Al evaluar la presencia de esta anomalía en larvas provenientes de los sitios estudiados (Capítulo 4) se determinó su presencia en larvas provenientes de las problemáticas agrícolas e industrial. En lo que respecta a la bibliografía ecotoxicológica consultada esta anomalía fue reportada en trabajos de laboratorio mediante la exposición de larvas a plaguicidas (Agostini *et al.*, 2010; Aronzon *et al.*, 2014; Lenkowski *et al.*, 2008; Lenkowski, Sanchez-Bravo, & McLaughlin, 2010; Moriyama *et al.*, 2011; Sansiñena *et al.*, 2018), metales (Luo *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2017). Además esta anomalía fue reportada en trabajos realizados en mesocosmos con exposición a camas de pollo y sedimentos con presencia de metales (Curi *et al.*, 2017; Peltzer *et al.*, 2013).

-Intestino reducido: Intestino que presenta una longitud menor a la normal con la



consecuente disminución de la cantidad de asas enrolladas. Si bien Batlle (1996) no define esta anomalía con un nombre particular, describe una anomalía en el intestino semejante a la descrita aquí. El origen de esta anomalía no fue descripto. Como se dijo en la descripción anterior, este tipo de anomalía se observó que ocurría junto con el desplazamiento del intestino. Al analizar las anomalías provocadas por exposición a contaminantes (Capítulo 2) se asoció esta anomalía con la exposición a mercurio, por otro lado al evaluar la toxicidad de sedimentos provenientes de sitios con diferentes usos del suelo

(Capítulo 3) se observó que esta anomalía ocurre con frecuencias significativas en larvas expuestas a muestras de la problemática urbanas. Por último esta anomalía fue observada en individuos provenientes de los sitios de la problemática agrícola. En lo que respecta a la bibliografía ecotoxicológica consultada, esta anomalía fue reportada por trabajos realizados en laboratorio mediante la exposición de larvas a plaguicidas (Agostini *et al.*, 2010; Aronzon *et al.*, 2014; Lajmanovich *et al.*, 2003; Lenkowski *et al.*, 2008; Lenkowski *et al.*, 2010; Moriyama *et al.*, 2011; Natale *et al.*, 2018).

-Hipo o Hiperpigmentación: Se trata de una alteración en el patrón normal de pigmentación



que se puede manifestar tanto por exceso (hiper) o por carencia o disminución (hipo) en cualquier área de la superficie de la larva (cuerpo, cola o piezas bucales). Esta anomalía se produce cuando se altera el número de melanóforos, distribución, tamaño o contracción o síntesis de melanina (Pandey & Tomar, 1985). Por ejemplo, algunos insecticidas organofosforados pueden provocar la liberación de la hormona hipofisaria estimulante de melanocitos, lo que produce un oscurecimiento en dosis bajas, pero aligeramiento a

dosis altas (Tomar & Pandey, 1988). Durante el desarrollo del presente trabajo de tesis se han observado cambios en la coloración en individuos luego de ser fijados, por lo que se debe ser cuidadoso al clasificar esta anomalía sólo en individuos vivos o bien preservados. Al evaluar la toxicidad de sedimentos provenientes de sitios con diferentes usos del suelo (Capítulo 3) se observó que la hipopigmentación ocurre con frecuencias significativamente altas en larvas expuestas a muestras de las problemáticas agrícola y urbana. Por otro lado, se observó hiperpigmentación en larvas provenientes de un sitio de la problemática industrial. En lo que respecta a la bibliografía ecotoxicológica consultada, alteraciones en la pigmentación del cuerpo fueron reportadas en trabajos de laboratorio mediante la exposición de larvas o embriones a plaguicidas (Brunelli *et al.*, 2009; Cooke, 1972; Moriyama *et al.*, 2011; Plowman *et al.*, 1994; Sansiñena *et al.*, 2018; G. Svartz, Meijide, & Coll, 2016), metales (Abbasi & Soni, 1984; Aguilón-Gutiérrez & Ramírez-Bautista, 2015; Calevro, Campani, Raghianti, Bucci, & Mancino, 1998; Luo *et al.*, 1993), y nonilfenol (Park *et al.*, 2017). Además, se han reportado alteraciones de coloración en larvas de campo (Severtsova *et al.*, 2012).

-Edemas: Es la presencia de exceso de líquido en intersticios tisulares, a nivel extracelular o



incluso intracavitario causando una hinchazón blanda tanto generalizada (en todo el cuerpo) como localizada, sea en el cuerpo o en la cola. La causa de esta anomalía es un desbalance homeostático de los líquidos corporales que puede ser causado por muchos estresores ambientales. En el desarrollo de este trabajo de tesis se han observado individuos con edemas pequeños en alguna región del cuerpo o la cola los cuales no presentaron problemas en su supervivencia. También se han observado individuos con edemas generales que presentaban alteraciones en la natación y supervivencia muy baja. Al analizar

las anomalías provocadas por exposición a contaminantes (Capítulo 2) se asoció esta anomalía con la exposición a Glifosato y Clorpirifos. Por otro lado, al evaluar la toxicidad de sedimentos (Capítulo 3) se observó que esta anomalía ocurre con frecuencias significativamente alta en larvas expuestas a muestras de las problemáticas agrícola, urbana e industrial. Por último, al evaluar la presencia de esta anomalía en larvas provenientes

de los sitios estudiados (Capítulo 4) su presencia se determinó en larvas provenientes de la problemática agrícola. En lo que respecta a la bibliografía ecotoxicológica consultada se van a citar trabajos que utilizan el término edema, pero cabe aclarar que muchas veces es difícil discernir entre edema (acumulación intracelular de fluidos) e hinchazón del cuerpo por aire debido a que no se detalla en los trabajos. La presencia de individuos con edemas fue reportada para varios trabajos en laboratorio mediante la exposición de larvas a plaguicidas (Allran & Karasov, 2000; Aronzon *et al.*, 2014; Aronzon *et al.*, 2011; Bach, Marino, Natale, & Somoza, 2018; Brunelli, Bernabò, Sperone, & Tripepi, 2010; Lajmanovich *et al.*, 2003; Lenkowski *et al.*, 2008; Lenkowski *et al.*, 2010; Liendro *et al.*, 2015; Moriyama *et al.*, 2011; Mussi & Calcaterra, 2010; Sotomayor *et al.*, 2012; Svartz *et al.*, 2012; Svartz, Meijide, *et al.*, 2016; Svartz, Aronzon, & Perez Coll, 2016; Svartz & Pérez-Coll, 2013; Svartz *et al.*, 2014), metales (Calevro *et al.*, 1998; Haywood *et al.*, 2004; Krishnamurthy & Smith, 2011; Luo *et al.*, 1993; Quintero & De Dulce, 1996) y otros (Park, Kang, & Gye, 2010; Romansic *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010; Stebler, Burks, Bantle, & Dawson, 1988; Wolkowicz *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018)

-Hinchazón corporal: Se manifiesta como un cuerpo hipergloboso e inflado a causa de la acumulación de aire tanto en toda la cavidad del cuerpo (aspecto de globo) así como en áreas del cuerpo más restringidas. A diferencia de la presencia de edemas, esta anomalía provoca que las larvas floten en la superficie y no puedan nadar sumergidas como lo hacen normalmente. Al evaluar la toxicidad de sedimentos (Capítulo 3) y la presencia de larvas anormales en los sitios de estudio se observó que esta anomalía ocurre con frecuencia en larvas de la problemática agrícola. Los trabajos que reportan anomalías de anfibios no diferencian entre edema (acumulación intracelular de fluidos) e hinchazón del cuerpo por aire, lo que impidió determinar la causa. Solo se detalla acumulación de gas en los trabajos de (Lajmanovich, Peltzer, Attademo, Cabagna-Zenklusen, & Junges, 2012), (Natale *et al.*, 2018) y Sansiñena *et al.* (2018).



-Ausencia de Queratodontes: Es la pérdida o falta de queratodontes que puede manifestarse tanto en una fila entera, así como en varios queratodontes de una o más filas en particular. Esta ausencia podría estar influenciada por elementos ingeridos. Además, esta anomalía fue asociada con infecciones del hongo *B. dendrobatidis* (Drake, Altig, Grace, & Walls, 2007; Kadkaru & Une, 2018). En la presente tesis se observaron individuos con falta de varios queratodontes en una o más filas los que no presentaron dificultad para alimentarse. Pero también se observaron individuos con falta total de queratodontes, los cuales tenían alteraciones en el intestino,



menor tamaño corporal y alteraciones en la alimentación normal. Al analizar las anomalías provocadas por exposición a contaminantes (Capítulo 2) se asoció esta anomalía con la exposición a Glifosato y Cromo. Por otro lado, al evaluar la toxicidad de sedimentos (Capítulo 3) se observó que esta anomalía ocurre con frecuencias significativamente altas en larvas expuestas a muestras de las problemáticas agrícolas, urbanas e industriales. Por último al evaluar la presencia de esta anomalía en larvas provenientes de los sitios estudiados (Capítulo 4) se determinó la presencia de la misma en larvas provenientes de las problemáticas agrícola e industrial. En lo que respecta a la bibliografía ecotoxicológica consultada, esta anomalía fue reportada por numerosos trabajos realizados en laboratorio mediante la exposición de larvas o embriones a plaguicidas (Babini, Salas, de Lourdes Bionda, & Martino, 2015; Bach, Natale, Somoza, & Ronco, 2016; Natale *et al.*, 2018) y a metales (Rowe, Kinney, Fiori, & Congdon, 1996) . También fue detectada en larvas de colecciones de museo (Medina, Ponssa, Guerra, & Aráoz, 2013) y en campo (Rowe, Kinney, & Congdon, 1998).

-Disposición anormal de queratodontes: Se manifiesta en filas de queratodontes que se disponen anormalmente, de forma ondulada o de manera diferente al patrón específico descrito para la especie (formula dentaria). Esta anomalía al igual que la anterior puede



suceder por la ingesta de partículas físicamente dañinas o por la acción de contaminantes y/o agentes patógenos. Los mecanismos de desarrollo y fisiológicos que causan estas deformidades son actualmente desconocidos. Dependiendo del grado de alteración en la disposición de los queratodontes, las larvas tendrán o no problemas para alimentarse. En los casos en que la disposición de los queratodontes se vea muy alterada los renacuajos no se alimentaran correctamente y presentaran problemas de

crecimiento y desarrollo (Venesky, Wassersug, & Parris, 2010). En el desarrollo de la presente tesis se observaron pocos individuos con este tipo de anomalía por lo que no se la pudo asociar a ningún contaminante ni problemática evaluada. Si bien las anomalías orales ocurren naturalmente (Drake *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2013), también pueden ocurrir en respuesta a diferentes estresores ambientales, por ejemplo metales (Rowe *et al.*, 1996), plaguicidas (Babini *et al.*, 2015) y patógenos (Drake *et al.*, 2007; Kadekaru & Une, 2018).

- Ausencia de Pico córneo: Se manifiesta como la pérdida o falta del pico córneo. Esta



anomalía puede ser causada por un daño mecánico por la ingesta de partículas o por la acción de contaminantes y/o patógenos, pero no se han estudiado los mecanismos que causan esta deformidad. La ausencia de pico córneo provoca que las larvas no se alimenten correctamente y presenten problemas de crecimiento y desarrollo. En la presente tesis se observó que esta

anormalidad ocurre conjuntamente con la reducción del intestino y en algunos casos con la presencia de cuerpos ventralmente cóncavos. Al evaluar la toxicidad de sedimentos (Capítulo 3) se observó que esta anormalidad ocurre con frecuencias significativamente altas en larvas expuestas a muestras de las problemáticas urbana e industrial. La literatura consultada sobre este tipo de anormalidad la asocian con el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*, el cual infecta los tejidos queratinizados de las piezas bucales de las larvas y causas deformidades o pérdida de dientes labiales y vainas de la mandíbula (Bach *et al.*, 2016; Fellers, Green, & Longcore, 2001; Marantelli, Berger, Speare, & Keegan, 2004).

4.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Desde hace más de dos décadas se han publicado trabajos que evidencian una creciente disminución de las poblaciones de anfibios a nivel global (*Collins et al.*, 2009; *Houlahan et al.*, 2000; *Young et al.*, 2004). Entre las posibles causas propuestas se destacan la alteración del hábitat por contaminación química y biológica (*Sparling, et al.*, 2010; *Croteau, et al.*, 2008; *Blaustein, et al.*, 2011). Como se comentó en la introducción, la ecotoxicología es una ciencia de síntesis que estudia de manera holística el origen, dinámica, transporte, destino, y finalmente el efecto biológico de los contaminantes y por lo tanto brinda un contexto apropiado para estudiar el efecto de contaminantes sobre especies de anuros.

Las investigaciones realizadas en ecotoxicología en anuros, se basó principalmente en datos provenientes de bioensayos de toxicidad de laboratorio, mientras que muy pocos estudios se desarrollaron en condiciones naturales. Actualmente se busca realizar estudios que posean el mayor realismo ecológico posible. Como parte del desarrollo del presente trabajo de tesis se lograron elaborar una serie de elementos que permiten plantear la etapa final de esta investigación se elaboró una clasificación de anormalidades, unificación de la nomenclatura, protocolo de bioensayo con sedimentos y la clasificación de toxicidad y peligrosidad de los sedimentos provenientes de los sitios estudiados, junto con la descripción y diagnóstico de la calidad ambiental de dichos sitios. Por tal motivo en el presente trabajo de tesis se: evalúan grupos de larvas provenientes de ecosistemas acuáticos afectados por distintos tipos de actividades antrópicas comparando dichos resultados con los observados en ensayos a laboratorio.

Los estudios sobre larvas de *B. pulchella* y *R. arenarum* se llevaron a cabo en 16 sitios que presentan distintos grados de actividad antrópica, y en los cuales se identificó la presencia de adultos y larvas de diferentes especies. Si bien en esta tesis no se realizó un estudio que permita estimar parámetros a nivel de población y comunidad, los relevamientos permitieron determinar la presencia de las especies de estudio en los diferentes sitios seleccionados (Ver capítulo 1). La presencia de larvas en los sitios correspondientes a la zona urbana, petroquímica y de desagües cloacales, se detectó en muy pocos sitios. Si bien esto podría deberse a algún factor de tipo histórico no ponderado en este estudio, teniendo en

consideración las características químicas de los sitios estudiados (Capítulo 1) y los resultados de los bioensayos (Capítulo 3), es muy probable que la ausencia de larvas de estas especies en estos sitios se deba al alto grado de contaminación en los mismos. Esta observación, además es coincidente con otros estudios que demuestran la existencia de diversos factores de estrés presentes en el ambiente y que operan sobre los patrones de diversidad de las especies de anuros (Agostini 2013; Peltzer *et al* 2008; Attademo *et al.*, 2014; Natale *et al* 2018).

La interpretación de los resultados obtenidos y su contextualización en el marco teórico aquí expuesto, permiten concluir que la presencia/ausencia de larvas de diferentes especies de anuros, brinda información sobre la calidad del ambiente.

Como ha sido indicado anteriormente la ocurrencia de mortalidad, inhibición del crecimiento y desarrollo y la alta prevalencia de anormalidades, en larvas de anuros que habitan charcas pertenecientes a ecosistemas afectados por actividades antrópicas, pueden estar directa o indirectamente relacionadas con la exposición a los contaminantes presentes en dichos ecosistemas. En este trabajo de tesis se observó, que las larvas de ambas especies provenientes de agroecosistemas presentaron un menor tamaño y peso corporal. Dichos resultados son acordes con los obtenidos en los bioensayos de laboratorio (Capítulo 3), donde se observó para ambas especies una inhibición significativa del crecimiento al ser expuestos desde EG8 y EG25. Según la bibliografía consultada en estos sitios se ha reportado la presencia de plaguicidas como Glifosato, Ácido Aminometilfosfónico, Atrazina, Trifluralina, Cipermetrina, Lamndacialotrina, Clorpirifos, Endosulfan, Acetaclor, Azoxystrobin, Epoxiconazole (Agostini *et al.*, 2013, Mac Louling *et al.*, 2017 y Sansiñena *et al.*, 2018) dichos contaminantes han demostrado provocar similares efectos (Inhibición en el crecimiento) en ensayos de laboratorio (Brunelli *et al.*, 2009; Agostini *et al.*, 2009; Svartz *et al* 2016; Lenkowski *et al* 2008), por lo tanto, este efecto puede ser claramente atribuido a la presencia de plaguicidas en el ambiente.

La evaluación de puntos finales subletales en larvas de anuros provenientes de ecosistemas acuáticos naturales y antropizados, brinda información que permite inferir la calidad del ambiente y el estado del ecosistema.

En cuanto a la presencia de individuos con anormalidades externas, en los sitios de referencia la prevalencia estuvo por debajo del nivel base sugerido por Read (1997) para larvas de anfibios, esto sumado a la ausencia de alteraciones observadas en las larvas expuestas a los sedimentos de estos sitios y la información fisicoquímica obtenida de estos sitios indican que resultan buenos sitios de referencia.

Por otro lado, la prevalencia de individuos con anormalidades externas en los sitios 4, 7, 24 y 25 de la problemática agrícola y los sitios 28 y 19 de la problemática industrial fueron significativamente mayores a las registrados en los sitios de referencia, y a los niveles basales

sugeridos por Read (1997). Aun así, al evaluar la prevalencia de los diferentes tipos de anomalías, en la mayor parte de los casos no resultaron significativas, a excepción del hallazgo de larvas anormales en el agroecosistema antes descrito, el que consideramos un caso particular.

La baja frecuencia de ocurrencia en hallazgos con individuos anormales, puede deberse a que las larvas que presentan anomalías morfológicas poseen una baja probabilidad de sobrevivir en ambientes naturales debido a diferentes causas: a) La gravedad o severidad de la anomalía provoca la muerte del individuo, como por ejemplo la presencia de edema general (esta anomalía fue observada en individuos expuestos en el ensayo crónico (Capítulo 3) y provocaron la muerte de los individuos a los tres días de ser observadas); b) La anomalía provoca una disminución en el fitness del individuo afectando la capacidad de las larvas de escapar de depredadores, o alimentarse como sucede con las alteraciones en la cola, la ausencia de queratodonte y picos córneos entre otras. Por lo tanto, el hallazgo en el campo de larvas anormales es poco frecuente, pero posee gran relevancia ecológica, ya que puede estar indicando la ocurrencia de un evento de contaminación que haya afectado parte de la población.

El hallazgo en el campo de larvas anormales posee gran relevancia ecológica y es un indicador de la ocurrencia previa de un evento de estrés sobre el ecosistema.

En los sitios afectados por las problemáticas industrial y agrícola la frecuencia de ocurrencia de anomalías resultó significativamente alta.

De los sitios seleccionados para la problemática industrial, solo en dos de ellos se halló la presencia de larvas, en estos sitios se hallaron individuos con Flexiones de la cola, Falta de Queratodonte, Intestinos desplazados e Hiperpigmentación, estos resultados son acordes a los obtenidos en los bioensayos con sedimentos de estos sitios, donde se detectaron las mismas anomalías a excepción de la hiperpigmentación (Capítulo 3). Según la bibliografía consultada en la zona de la problemática industrial se han detectado altas concentraciones de metales pesados como el Cobre, Zinc, Plomo y Mercurio, Hidrocarburos totales y plaguicidas (DDT) (Colombo *et al.*, 1990, Greenpeace 2000; Palermo *et al.*, 2011 y Ronco *et al.*, 2008). En ensayos de laboratorio se ha demostrado que estos contaminantes pueden provocar anomalías en larvas de anuros. Por ejemplo, Unrine *et al* (2004) reportaron la presencia de individuos con flexiones de la cola al administrarles mercurio en la dieta. Por otro lado, Park *et al* (2017) informaron sobre la presencia de individuos con flexiones de la cola y alteración en el intestino cuando se los expuso como embriones a diferentes concentraciones de Níquel. Alteraciones en el disco oral en larvas de anfibios fueron reportadas por Rowe *et al* (1996) en un estudio a campo con cenizas de residuos con metales. Si bien estas anomalías también se han reportado en estudios de exposición a otros estresores (Babini *et al* 2006, Lenkowski *et al* 2008, Zhang *et al* 2018) y considerando

la matriz ambiental a la cual están expuestas estas larvas es probable que estas anomalías se deban a la presencia de diferentes tipos de contaminantes en el ambiente.

En cinco de los siete sitios seleccionados para evaluar la problemática agrícola se detectó la presencia de larvas de las especies de estudio. En estos sitios se hallaron individuos con Flexiones de la cola, Falta de queratodotes, Edemas y Cuerpos hinchados. Estos resultados fueron acordes con los obtenidos en bioensayos con sedimentos de estos sitios. En particular la presencia de individuos con cuerpos hinchados (con presencia de aire en el cuerpo) fue registrada sólo para esta problemática observándose tanto en individuos expuestos a sedimentos como en individuos provenientes del campo. Al consultar la bibliografía sólo se encontraron tres trabajos que reportan claramente esta anomalía (ya que en la mayoría de los trabajos no se hace una clara diferenciación entre edema e hinchazón). En estos trabajos, la presencia de individuos con cuerpos hinchados fue asociada con el uso de agroquímicos. Lajmanovich *et al* (2012) reportan larvas de la especie *Dendropsophus nanus* que presentaron esta anomalía y, en este caso, los autores hablan de “Edemas abdominales” y “Natación inversa”. En la foto que presentan, las larvas se encuentran hinchadas y flotando sobre la superficie del agua de igual manera a las registradas y numeradas como larvas hinchadas en este trabajo de tesis. Natale *et al* (2018) reportó esta anomalía en larvas de *B. pulchella* expuestas a Aficida, en este caso los autores hablan de “Edemas”, pero al igual que en el caso anterior la foto presentada en el trabajo y la descripción de la anomalía indican que las larvas presentaban aire. Por último Sansiñena *et al* (2018) reportan la presencia de larvas de *B. pulchella* que al ser expuestas a sedimentos provenientes de agroecosistemas presentaron esta anomalía, llamándola en este caso “presencia de aire subcutáneo”. Considerando, que, hasta el momento, esta anomalía ha sido relacionada solo con el uso de Agroquímicos la ocurrencia de la misma puede que sea un efecto específico de determinados plaguicidas o los surfactantes empleados en sus formulaciones.

En el caso del hallazgo de gran cantidad de larvas de *R. arenarum* anormales en los sitios 24 y 25 de la problemática agrícola, resulta importante destacar que las charcas reproductivas donde ocurrió este evento se localizan en medio del campo de cultivo, por lo tanto, pueden recibir aplicaciones directas, que ocasionen eventos de toxicidad aguda.

Consideramos, por lo tanto, que la presencia de anomalías detectadas se debe a exposiciones de tipo agudo (altas concentraciones en cantidades suficientes). Para que ocurra este tipo de eventos debe haber una coordinación temporal y espacial de varios factores: 1) Un evento de fumigación que provoque la llegada de una cantidad suficiente de un contaminante al cuerpo de agua como para alcanzar concentraciones que provoquen efectos biológicos; 2) que las condiciones hidrológicas y meteorológicas sean adecuadas para permitir la reproducción de la población de la especie y, que ocurra la reproducción de la especie. Si consideramos que dichos eventos son de tipo agudo, y poseen un efecto letal sobre

los individuos, la probabilidad de detectar estos eventos es baja por lo que la presencia del investigador debe también ser oportuna.

La ocurrencia de eventos de exposición aguda, causados por la llegada de una cantidad elevada de contaminantes al ecosistema de manera abrupta, puede provocar daños significativos a nivel poblacional, más aun si coincide con un evento reproductivo.

La regulación de las actividades asociadas al manejo y aplicación de plaguicidas, en particular el control sobre el desarrollo de buenas prácticas de dichas actividades merece particular atención.

La ocurrencia de anomalías en órganos internos presenta baja prevalencia.

Se hallaron individuos con presencia de cuerpos grasos hipopigmentados y puntos negros en el hígado, provenientes de la problemática industrial, en estos individuos también se observó una marcada hiperpigmentación externa lo cual puede indicar que estos individuos presentan alteraciones en la distribución o contracción de la melanina (Pandey & Tomar 1985). Aun así, hacen falta más estudios para determinar si los puntos negros hallados en el hígado corresponden a concentración de melanóforos o alguna otra patología como ser la necrosis del órgano.

Por otro lado, en los sitios pertenecientes al agroecosistema y a uno de los sitios de referencia se hallaron individuos con gránulos en la vesícula biliar, estos gránulos podrían ser cálculos de la vesícula formados por un aumento de colesterol o por disminución de sales biliares y lecitina, lo cual lleva a una sobresaturación y precipitación del colesterol biliar, en forma de cristales. Aun así, hacen falta más estudios para determinar la composición de los gránulos hallados.

El estudio en profundidad de las causas y etiología de estas patologías y su asociación con la ocurrencia de anomalías externas detectadas se continuará a nivel posdoctoral, donde se realizarán estudios histopatológicos de las mismas.

Como ya se mencionó anteriormente, los biomarcadores pueden ser evaluados a diferentes niveles. Entre más bajo sea el nivel de organización, el efecto podrá ser identificado con mayor anticipación y se podrán tomar las medidas preventivas y correctivas adecuadas para evitar el problema. Lo contrario ocurre cuando el efecto se detecta en los mayores niveles de organización, como por ejemplo efectos a nivel reproductivo o sobre la diversidad, los que serán difíciles de remediar o directamente irreversibles.

Si bien en el desarrollo de la tesis no se realizó un estudio detallado de las poblaciones de anuros a campo, mediante los relevamientos realizados tanto de adultos como de larvas, se evidenció la ausencia de ambas especies de estudio en las zonas industrial, urbana y cloacal. Dichas observaciones pueden estar indicando que estos sitios se encuentran contaminados a

tal nivel que las poblaciones de anuros de la región ya no se reproducen en estos sitios. Por otro lado, en aquellos sitios donde se determinó la presencia de larvas, se lograron observar efectos a nivel de organismo con prevalencias elevadas de individuos anormales e inhibición del crecimiento, lo que estaría demostrando que las poblaciones que habitan estos sitios están en riesgo provocado por la contaminación.

Los resultados obtenidos en el Capítulo 3, en el cual se evaluó la toxicidad de los sedimentos provenientes de los mismos sitios de estudio, mostraron los mismos resultados, es decir las muestras de sedimentos provenientes de los sitios en los cuales no se detectó presencia de larvas mediante el monitoreo, causaron alta mortalidad y efectos subletales, lo que demuestra su toxicidad.

Por lo tanto, los estudios a campo y laboratorio deben ser empleados como estrategias integradas para valorar los efectos adversos de los contaminantes sobre los anuros autóctonos.

CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES

Los resultados presentados en el capítulo 1, permiten concluir que **los sitios de estudio presentan características específicas que permiten por un lado diferenciarlos entre sí, y, por otro lado, vincular dichas características con las problemáticas ambientales evaluadas.** Es decir, que la interpretación conjunta de los resultados obtenidos a partir de los relevamientos de los sitios y su caracterización fisicoquímica, más la información proveniente de las publicaciones preexistentes, aportaron información suficiente que permitió caracterizar los sitios en función del tipo de contaminación que estos presentan, como consecuencia de las actividades que se desarrollan a su alrededor.

Los resultados del relevamiento de la anfibiofauna en los sitios de estudio permitieron evidenciar la ausencia de algunas especies en los sitios más afectados, en periodos en los que se constató la actividad de estas especies en otros sitios del área de estudio. Si bien sabemos que la estimación de parámetros a nivel comunidad (como ser la presencia-ausencia de especies o la riqueza específica) requieren la realización de estudios detallados, y en particular durante periodos de tiempo prolongados, consideramos que los resultados obtenidos en el contexto de la investigación, brindan herramientas para considerar **a las especies: *Scinax squalirostris*; *Scinax granulatus*; *Odontophrynus americanus*; *Ceratophrys ornata* y *Leptodactylus gracilis*, buenos candidatos para ser utilizados como especies indicadoras de la calidad del ambiente, debido a su modo de vida, la alta sensibilidad, y su ausencia en los sitios más afectados.**

Mediante estos relevamientos se corroboró la presencia y la ocurrencia de la reproducción de las especies de estudio (*R. arenarum* y *B. pulchella*) en al menos un sitio de cada problemática evaluada. Los eventos reproductivos de estas especies ocurrieron de acuerdo a lo esperado según las condiciones meteorológicas presentadas en cada año de investigación, y de manera simultánea en el área de estudio, esto permitió planificar y diseñar los muestreos que contemplan los períodos reproductivos de las especies estudiadas.

A partir de la recolección de datos morfológicos vinculados al estado reproductivo de hembras pertenecientes a una población de *B. pulchella* presente en el sitio 3 (referencia), junto con información previa generada por el grupo de trabajo, se logró establecer un valor umbral de referencia que permitió distinguir hembras que se encontraban reproductivamente maduras y en condiciones de oviponer, de las que no lo estaban de manera precisa.

El mantenimiento en cautiverio de adultos de *B. pulchella* en las condiciones establecidas fue exitosa, lo que se reflejó en el aumento del índice de condición corporal de los individuos a lo largo del periodo estudiado. **Los resultados de las pruebas de inducción**

artificial aportaron evidencias sobre su factibilidad y posible aplicación en esta especie.

Por lo tanto, se puede concluir que **el uso del índice de condición corporal, junto con la información proveniente de monitoreos de poblaciones durante la época reproductiva, resulta una herramienta eficaz para distinguir hembras en estado reproductivo óptimo que permita la inducción artificial de la reproducción por el método AMPHIPLEX de manera exitosa.**

El método de inducción artificial de la reproducción AMPHIPLEX funciona en la especie *B. pulchella*. Este resultado posee gran relevancia debido a que permite considerar a esta especie como modelo de estudio, ya que según estudios previos la especie se puede mantener en condiciones controladas de laboratorio, sin inconvenientes durante todas las etapas de su ciclo de vida (larvas, juveniles y adultos).

Los datos obtenidos de relevamientos en campo, y del mantenimiento de larvas en laboratorio presentados en el Capítulo 2 permiten concluir que los embriones y larvas de ***B. pulchella* y *R. arenarum* resultan adecuadas para emplear como organismos prueba en la realización de experimentos en condiciones de laboratorio, así como también en el desarrollo de bioensayos de toxicidad aguda con sedimentos completos.**

En particular la información obtenida producto del mantenimiento de las larvas en laboratorio y su posterior descripción morfológica permitió generar información de base sobre aspectos fisiológicos y morfológicos de las larvas de ambas especies estudiadas. El análisis estadístico de esta información permitió establecer valores normales de referencia en cuanto a su morfología, tasas de crecimiento, desarrollo y supervivencia, las que resultaron acordes a las reportadas para estas especies en estudios de laboratorio y en la naturaleza. Considerando lo antes expuesto se puede concluir que **los parámetros estimados para larvas de *Boana pulchella* y *Rhinella arenarum*, criadas desde huevos en las condiciones establecidas de laboratorio pueden emplearse como valores normales de referencia con fines comparativos en estudios ecotoxicológicos.** Esto permitió establecer parámetros normales y material de referencia que fue útil a la hora de realizar comparaciones para determinar anormalidades en larvas expuestas en bioensayos de laboratorio, así como también en larvas colectadas en el campo.

El análisis de la información resultante de la búsqueda bibliográfica de trabajos ecotoxicológicos en los que utilizaran la presencia de anormalidades morfológicas como punto final de evaluación, sumado a la información obtenida a partir del análisis de presencia y frecuencia de ocurrencia de anormalidades en larvas de *R. arenarum* provocadas por contaminantes de relevancia ambiental permite concluir que **los factores de estrés y en particular la exposición a sustancias químicas, afectan las**

características morfológicas de las larvas ocasionando la expresión de anomalías.

Además, los resultados obtenidos brindan información que permite **asociar la expresión de anomalías con la exposición a factores de estrés, y en particular la exposición a sustancias químicas.**

Lo anteriormente mencionado, constituye una evidencia a favor del argumento que **propone el empleo de la presencia de anomalías en larvas de anuros como punto final de evaluación ecotoxicológico y posible biomarcador de efecto.**

El hecho de no poder asociar un tipo de anomalía con un factor particular se vincula con la expresión de un mismo tipo de anomalía como resultado de la exposición a diferentes factores, sean físicos, químicos o biológicos. La información disponible, permite afirmar que diferentes estresores ambientales presentados en la misma etapa del desarrollo ocasionan errores similares en el desarrollo causando el mismo tipo de anomalía. Por otro lado, mediante la revisión bibliográfica se hizo evidente que, en la mayor parte de los trabajos ecotoxicológicos solo se hace referencia al tipo de anomalía registrada, y dicha información no se contextualiza adecuadamente, ya que en la mayor parte de los casos la evaluación de anomalías escapa al objetivo de ese trabajo. Al intentar obtener información con mayor detalle, nos encontramos que dichas menciones no poseen descripciones anatómicas, morfológicas o soporte gráfico que la acompañe, lo cual dificulta analizar, corroborar y reconocer dichas anomalías, al momento de analizar de manera integral la información existente. Si a esto le sumamos la falta de una nomenclatura común para las anomalías, vemos que la información existente es escasa y resulta imprecisa. A partir de detectar este hueco en la investigación, fue que se propuso elaborar una nomenclatura unificada que permita identificar los diferentes tipos de anomalías mencionadas en la literatura, acompañada de una descripción detallada de las mismas e imágenes.

La elaboración de una lista de anomalías, que contempla una nomenclatura unificada, junto con una descripción detallada acompañada de imágenes (y material de referencia), permitió realizar un análisis adecuado y preciso del punto final propuesto. La incorporación de esta nomenclatura como base e insumo útil y necesario para el desarrollo de la herramienta bioanalítica propuesta en esta tesis (Bioensayo de toxicidad aguda con sedimentos completos), permitió además lograr una discusión satisfactoria de los resultados obtenidos respecto de la información existente en la literatura científica.

En el capítulo 3 Se logró adecuar los protocolos de bioensayos de sedimentos estandarizados (USEPA- ASTM) con el fin de incorporar las especies de estudio. El protocolo propuesto se puso a prueba mediante la realización de 15 experimentos, que permitieron evaluar de manera satisfactoria la toxicidad de muestras de sedimentos completos, provenientes de los sitios de estudio.

Los requerimientos en cuanto a la infraestructura y equipamiento necesarios para la realización de los bioensayos son de baja complejidad, resulta accesible y económico, la ejecución de estas pruebas requiere de periodos de tiempo relativamente cortos, y los procedimientos prácticos involucrados en el desarrollo del mismo resultan simples. **Por lo tanto, se concluye que el protocolo propuesto, producto de la adecuación de los protocolos normalizados preexistentes, para el empleo de especies autóctonas, resulta una herramienta útil, accesible y de sencilla ejecución, que brinda información precisa y confiable sobre la calidad del ambiente, a partir de la evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre especies representativas de los ecosistemas locales.**

El análisis de los resultados obtenidos y la información proveniente de la experiencia adquirida durante el desarrollo del protocolo propuesto, permiten concluir que la adecuación y puesta a punto de los protocolos normalizados para ser utilizados con las especies autóctonas propuestas, se llevó a cabo exitosamente, alcanzando uno de los objetivos propuestos al lograr elaborar un protocolo para la realización de bioensayos de toxicidad aguda con sedimento usando larvas de las especies *R. arenarum* y *B. pulchella*

Es importante destacar que es la primera vez que se utilizan larvas de las especies autóctonas *R.arenarum* y *B. pulchella* para evaluar la toxicidad de muestras de sedimentos.

Los resultados obtenidos a partir de la aplicación del protocolo propuesto, así como las variantes practicadas, permiten concluir que la utilización de bioensayos con sedimentos completos, aplicando el protocolo propuesto permite evaluar la respuesta a nivel individual (efectos letales y subletales) de larvas de *R. arenarum* y *B. pulchella* en diferentes estadios de desarrollo, permitiendo clasificar la toxicidad y peligrosidad de los sedimentos, y realizar inferencias sobre la calidad del ambiente y el estado de los ecosistemas evaluados.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que las dos especies seleccionadas respondieron de manera satisfactoria y resultan adecuadas para su incorporación como organismos prueba en este tipo de bioensayos.

Los resultados obtenidos constituyen líneas de evidencia a favor de la utilidad de *B. pulchella* como especie modelo de estudio sensible y útil al momento de evaluar efectos provocados por la contaminación química y las actividades antrópicas sobre ecosistemas acuáticos.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la etapa más sensible del desarrollo en ambas especies evaluadas por medio del protocolo propuesto es la etapa embrionaria EG8.

También los diferentes bioensayos realizados aportan evidencias que indican una disminución de la sensibilidad de los individuos conforme crecen y se desarrollan.

Los resultados permiten concluir que los bioensayos de toxicidad con sedimentos empleando larvas de *R. arenarum* y *B. pulchella* resultan una herramienta eficaz para clasificar la toxicidad y peligrosidad de sedimentos asociada a la presencia de compuestos tóxicos en los sedimentos de ecosistemas acuáticos.

Al comparar los resultados obtenidos al aplicar el protocolo propuesto para realizar bioensayos de sedimentos con larvas de *B. pulchella* con un ensayo estandarizado de referencia como lo es el de *H. curvispina*, se pudo observar que la especie *H. curvispina* resultó ser más sensible, lo que era de esperar considerando el perfil químico del agroecosistema. Por otro lado, la especie *B. pulchella* brindó información complementaria y significativa, por lo tanto concluimos **que el bioensayo con sedimentos aplicando el protocolo propuesto para *B. pulchella* brinda resultados acordes y complementarios respecto del bioensayo estandarizado de *H. curvispina*.** Por lo tanto, los resultados obtenidos validan la utilización del protocolo propuesto para evaluar toxicidad de sedimentos y apoyan la propuesta de utilizar a *B. pulchella* como una especie modelo para diagnosticar la calidad ambiental.

La interpretación de los resultados del empleo de las tasas de crecimiento y desarrollo, como puntos finales de evaluación en bioensayos de toxicidad con sedimento completo permite considerarlos útiles e informativos. La evaluación de estos puntos finales en conjunto, aportan información complementaria a la evaluación de efectos letales, permitiendo detectar efectos a nivel subletal de relevancia ecológica.

El análisis de la información generada permite concluir que las larvas expuestas a sedimentos provenientes de sitios contaminados presentan una mayor frecuencia de ocurrencia de anormalidades, respecto a larvas expuestas a sedimentos provenientes de zonas de referencia.

En el Capítulo 4 los monitoreos realizados en los sitios de estudio permitieron evidenciar que las larvas de las especies de estudio no están presentes en todos los sitios estudiados, en particular en los sitios vinculados con las problemáticas urbana, industrial y de descargas cloacales. Teniendo en consideración las características químicas de los sitios estudiados (Capítulo 1) y los resultados de los bioensayos (Capítulo 3), es muy probable que la ausencia de estas especies en estos sitios se deba a un mayor grado de contaminación, esto nos permite concluir que **las larvas de anuros de las especies de estudio son buenas indicadoras de la calidad ambiental de los ecosistemas que habitan.**

La interpretación de los resultados obtenidos y su contextualización en el marco teórico aquí expuesto, permiten concluir que la presencia/ausencia de larvas de diferentes especies de anuros, brindan información sobre la calidad del ambiente.

La evaluación de puntos finales subletales en larvas de anuros provenientes de ecosistemas acuáticos naturales y antropizados, brindan información que permite inferir la calidad del ambiente y el estado del ecosistema.

La evaluación del conjunto de caracteres morfológicos externos e internos de las larvas provenientes de los sitios de estudio, permitió evidenciar alteraciones en larvas provenientes de sitios afectados. En particular en los sitios asociados a las problemáticas agrícola e industrial se encontraron larvas de menor tamaño, con mayor índice hepatosomático y presencia de anormalidades y parásitos tanto internos como externos. Mientras que, en los sitios de referencia la prevalencia de anormalidades resultó dentro de los valores normales determinados para larvas en campo. Por lo tanto, se concluye que, **las larvas provenientes de los sitios afectados por las actividades antrópicas estudiadas presentan mayor prevalencia de anormalidades respecto a los sitios de referencia.**

La interpretación de los resultados obtenidos en el contexto ecotoxicológico, considerando la información existente en la actualidad, permiten concluir que el hallazgo en el campo de larvas anormales posee gran relevancia ecológica y puede interpretarse como un indicador (o simplemente evidencia) de la ocurrencia previa de un evento de estrés que provocó efectos adversos sobre el ecosistema. Es oportuno señalar que la frecuencia de ocurrencia de anormalidades tanto internas como externas de larvas de campo fue baja, lo que puede deberse a la baja probabilidad de sobrevivencia que presentan las larvas anormales, al menos con anormalidades clasificadas como severas o de alta severidad.

Considerando los resultados obtenidos en los capítulos previos en los cuales se pudo determinar que la ocurrencia de anormalidades se produce tempranamente, manifestándose incluso antes de que los individuos presenten inhibición del crecimiento y mortalidad, y teniendo en cuenta que un buen biomarcador debe responder tempranamente al factor que se está evaluando, se puede concluir que la morfología de las larvas y en particular, **la expresión de anormalidades, resulta un punto final de evaluación válido, el que puede emplearse como indicador de la calidad del ambiente.**

La ocurrencia de eventos de tipo agudo, causados por la llegada de una cantidad elevada de contaminantes de manera abrupta, puede provocar daños significativos a nivel poblacional, más aún cuando ocurre en coincidencia con un evento reproductivo.

La regulación de las actividades asociadas con el manejo y aplicación de plaguicidas, en particular la medida de control sobre el desarrollo de buenas prácticas merece particular atención.

De todos los procedimientos desarrollados se recomienda el empleo de ensayos con exposición de embriones de *B. pulchella* en estadio 8 de desarrollo, como la variante de la herramienta analítica desarrollada con mayor sensibilidad de respuesta.

Finalmente, se considera que el trabajo de tesis brinda información confiable y novedosa sobre la ocurrencia de anomalías en larvas de anuros, sus causas y sus consecuencias. Igualmente guarda una relación entre las hipótesis planteadas y los resultados obtenidos, sustentado por una detallada metodología experimental

Plantea nuevas preguntas e hipótesis producto de la investigación y finalmente, aporta elementos para abordar la discusión acerca del posible empleo de la presencia de anomalías como biomarcadores y a las larvas de anuros autóctonas como indicadores de la contaminación ambiental y su incorporación en programas de monitoreo y diagnóstico de la calidad ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, S., & Soni, R. (1984). Teratogenic effects of chromium (VI) in environment as evidenced by the impact on larvae of amphibian *Rana tigrina*: Implications in the environmental management of chromium. *International Journal of Environmental Studies*, 23(2), 131-137.
- Acosta, G. N., Baldo, D., Kolenc, F., Borteiro, C., & Candiotti, F. V. (2017). Embryonic morphology in five species of *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Herpetological Journal*, 27(2).
- Acosta, R., Mesones, R. V., & Núñez, A. (2005). Fauna de anuros en la ciudad de Salta, Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 569-575.
- Adeola, F. O. (2004). Boon or bane? The environmental and health impacts of persistent organic pollutants (POPs). *Human Ecology Review*, 27-35.
- Adámoli, J. (2005). Problemas ambientales de la agricultura en la región chaqueña. *La situación ambiental Argentina*, 436-442.
- Agency, E. E. (2008) *Impacts of Europe's changing climate: 2008 indicator-based assessment*. European Communities.
- Agostini, M., Natale, G., & Ronco, A. (2009). Impact of endosulphan and cypermethrin mixture on amphibians under field use for biotech soya bean production. *International Journal Environment and Health*, 3(4), 379-389. doi:10.1504/IJENVH.2009.030109
- Agostini, M., Natale, G., & Ronco, A. (2010). Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology*, 19(8), 1545-1550. doi:10.1007/s10646-010-0539-3.
- Agostini, M. G. (2013a) *Ecotoxicología de anfibios en agroecosistemas del noreste de la Región Pampeana*. Ph.D, Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Sedici.
- Agostini, M., Kacolicris, F., Demetrio, P., Natale, G., Bonetto, C., & Ronco, A. (2013b). Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems in northeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104(2), 163-171. doi:10.3354/dao02592
- Agostini, M. G., Saibene, P. E., Roesler, C. I., & Bilenca, D. N. (2016). Amphibians of northwestern Buenos Aires province, Argentina. *Checklist, range extensions and comments on conservation*, 12(6), 1-10.
- Agrawal, A. A. (2001). Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science*, 294(5541), 321-326.
- Aguillón-Gutiérrez, D., & Ramírez-Bautista, A. (2015). Anomalías frecuentes en una población de *Hyla plicata* (Anura: Hylidae) expuesta a plomo y hierro durante el desarrollo postembrionario. *Biocyt*, 8, 515-529
- Alcalde, L. (2005). Descripción de la musculatura craneana en larvas de anuros de las familias Hylidae y Leptodactylidae. *Revista del Museo de La Plata*, 16(168), 1-12.
- Alford, R. A., & Richards, S. J. (1999). Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual review of Ecology and Systematics*, 30(1), 133-165.

- Allran, J., & Karasov, W. (2000). Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(11), 2850-2855.
- Allan, I. J., House, W. A., Parker, A., & Carter, J. E. (2004). Transport and distribution of lindane and simazine in a riverine environment: measurements in bed sediments and modelling. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 60(5), 417-433.
- Allan, I., & Stegemann, J. (2007). Modelling of pollutant fate and behaviour in bed sediments. In *Sustainable Management of Sediment Resources* (Vol. 1, pp. 263-294): Elsevier.
- Altwegg, R., & Reyer, H. U. (2003). Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, 57(4), 872-882.
- Antoniazzi, C. E., López, J. A., Duré, M., & Falico, A. (2013). Alimentación de dos especies de anfibios (Anura: Hylidae) en la estación de bajas temperaturas y su relación con la acumulación de energía en Santa Fe, Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 61(2).
- APHA. (1998). American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater (20th ed.). Baltimore: American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation.
- Arellano, M. L., Natale, G. S., Grilli, P. G., Barrasso, D. A., Steciow, M. M. and Lavilla, E. O. (2017) 'Host-pathogen relationships between the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* and tadpoles of five South American anuran species', *Herpetological Journal*, 27(1).
- Arndt, U., & Schweizer, B. (1991). The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. *Biological monitoring: signals from the environment*, 199-260.
- Aronzon, C. M., Sandoval, M. T., Herkovits, J., & Pérez-Coll, C. S. (2011). Stage-dependent toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental toxicology*, 26(4), 373-381
- Aronzon, C. M., Marino, D. J., Ronco, A. E., & Pérez Coll, C. S. (2014). Differential toxicity and uptake of Diazinon on embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, 100, 50-56.
- ASoIaH, A. (2004). Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research. *Herpetological Animal Care and Use Committee of the ASIH*.
- ASTM. (2007). *Standard guide for conducting whole sediment toxicity tests with amphibians*. Retrieved from West Conshohocken:
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., & Lajmanovich, R. C. (2005). Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, ecosystems & environment*, 106(4), 389-394.
- Attademo, A. M., Cabagna-Zenklusen, M., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Junges, C., & Bassó, A. (2011). B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). *Ecotoxicology*, 20(1), 274-282.

- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Junges, C. M., & Basso, A. (2014). Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 186(1), 635-649
- Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., Bossy, C., & Lavaux, G. (2004). Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied Geochemistry*, 19(5), 769-786.
- Babini, M. S., Salas, N. E., de Lourdes Bionda, C., & Martino, A. L. (2015). Implicaciones de la urbanización en la presencia, distribución y ecología reproductiva de la fauna de anuros de una ciudad del área central de Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(1), 188-195.
- Babini, M. S., de Lourdes Bionda, C., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2016). Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental monitoring and assessment*, 188(8), 459.
- Bach, N. C., Natale, G. S., Somoza, G. M., & Ronco, A. E. (2016). Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(23), 23959-2397
- Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297.
- Balinsky, B. I. (1983). *Introducción a la embriología*.
- Bantle, J. (1995). FETAX—A developmental toxicity assay using frog embryos. *Fundamentals of aquatic toxicology*, 207-230. Bantle, J. A. (1991). *Atlas of abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX*. Oklahoma State University: Printing Services.
- Bantle, J. A. (1991). *Atlas of abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX*. Oklahoma State University: Printing Services
- Baraquet, M., Salas, N. and Di Tada, I. E. (2007) 'Variación geográfica en el canto de advertencia de *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) en Argentina', *Revista española de herpetología*, (21), pp. 107-118.
- Baraquet, M., Salas, N. E. and Martino, A. L. (2013) 'Advertisement calls and interspecific variation in *Hypsiboas cordobae* and *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) from central Argentina'.
- Barinaga, M. (1990). Where have all the froggies gone? *Science*, 247(4946), 1033-1035.
- Barrionuevo, J. S., Aguayo, R., & Lavilla, E. O. (2008). First record of chytridiomycosis in Bolivia (*Rhinella quechua*; Anura: Bufonidae). *Diseases of aquatic organisms*, 82(2), 161-163.
- Baskin, S. I., & Dagirmanjian, R. (1973). The effect of taurine on the pigmentation of the bullfrog tadpole. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 44(2), 297-302.
- Beebee, T., Flower, R., Stevenson, A., Patrick, S., Appleby, P., Fletcher, C., Battarbee, R. (1990). Decline of the natterjack toad *Bufo calamita* in Britain:

- palaeoecological, documentary and experimental evidence for breeding site acidification. *Biological Conservation*, 53(1), 1-20.
- Belden, L. K., & Blaustein, A. R. (2002). Exposure of red-legged frog embryos to ambient UV-B radiation in the field negatively affects larval growth and development. *Oecologia*, 130(4), 551-554. doi:10.1007/s00442-001-0843-y
- Benoit, J., Mason, R. P., Gilmour, C. C., & Aiken, G. R. (2001). Constants for mercury binding by dissolved organic matter isolates from the Florida Everglades. *Geochimica et cosmochimica acta*, 65(24), 4445-4451.
- Besada, V., González, J., & Schultze, F. (2006). Concentraciones de mercurio, cadmio, plomo, arsénico, cobre y zinc en atún blanco, rabil y patudo procedentes del Océano Atlántico. *Ciencias Marinas*, 32(2B), 439-445.
- Berger, L., Roberts, A. A., Voyles, J., Longcore, J. E., Murray, K. A., & Skerratt, L. F. (2016). History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. *Fungal Ecology*, 19, 89-99.
- Bettinetti, R., Giarei, C., & Provini, a. (2003). Chemical analysis and sediment toxicity bioassays to assess the contamination of the River Lambro (Northern Italy). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45(1), 72-78. doi:10.1007/s00244-002-0126-6
- Bionda, C., Kost, S., Salas, N. E., Lajmanovich, R. C., Sinsch, U., & Martino, A. L. (2015). Age structure, growth and longevity in the common toad, *Rhinella arenarum*, from Argentina. *Acta Herpetologica*, 10(1), 55-62.
- Bionda, C., Lajmanovich, R., Salas, N., Martino, A. and di Tada, I. (2013) 'Population demography in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) and *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leiuperidae) in agroecosystems in the province of Córdoba, Argentina', *Revista de biología tropical*, 61(3), pp. 1389-1400.
- Bionda, C. L., Lajmanovich, R. C., Salas, N. E., Martino, A. L., & di Tada, I. E. (2011). Reproductive ecology of the common South American toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. *Journal of Herpetology*, 45(2), 261-265.
- Birge, W. J., Black, J. A., & Kuehne, R. A. (1980). Effects of organic compounds on amphibian reproduction. *Research reports*, 121.
- Birge, W., & Black, J. (1977). Sensitivity of vertebrate embryos to boron compounds: *US Environmental Protection Agency*. Retrieved from
- Blaustein, A. R., & Wake, D. B. (1995). The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American*, 272(4), 52-57.
- Blaustein, A. R., Wake, D. B., & Sousa, W. P. (1994). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation biology*, 8(1), 60-71.
- Blaustein, A. R., Kiesecker, J. M., Chivers, D. P., & Anthony, R. G. (1997). Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13735-13737.
- Blaustein, A. R., & Kiesecker, J. M. (2002). Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology letters*, 5(4), 597-608.
- Blaustein, A. R., & Johnson, P. T. (2003). Explaining frog deformities. *Scientific American*, 288(2), 60-65.
- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., & Scheessele, E. A. (2005). Ambient levels of ultraviolet-B radiation cause mortality in juvenile western toads, *Bufo boreas*. *The American midland naturalist*, 154(2), 375-383.

- Blitz, I. L., Andelfinger, G., & Horb, M. E. (2006). *Germ layers to organs: using Xenopus to study "later" development*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
- Boga, A., Emre, M., Sertdemir, Y., Uncu, İ., Binokay, S., & Demirhan, O. (2016). Effects of GSM-like radiofrequency irradiation during the oogenesis and spermiogenesis of *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *129*, 137-144.
- Boone, M. D., Semlitsch, R. D., Little, E. E., & Doyle, M. C. (2007). Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. *Ecological Applications*, *17*(1), 291-301.
- Borges, R. E., de Souza Santos, L. R., Assis, R. A., Benvindo-Souza, M., Franco-Belussi, L., & de Oliveira, C. (2019). Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(3), 2623-2634.
- Borteiro, C., Cruz, J. C., Kolenc, F. and Aramburu, A. (2009) 'Chytridiomycosis in frogs from Uruguay', *Diseases of aquatic organisms*, *84*(2), pp. 159-162.
- Borteiro, C., Cruz, J. C., Kolenc, F., Verdes, J. M., Moraña, A., Debat, C. M., Kun, A., Ubilla, M. and Okada, K. (2014) 'Dermocystid-chytrid coinfection in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae)', *Journal of wildlife diseases*, *50*(1), pp. 150-153.
- Borteiro, C., Castro, O., Sabalsagaray, M. J., Kolenc, F., DEBAT, C. M. and Ubilla, M. (2015a) 'Spargana in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) from Uruguay', *North-Western Journal of Zoology*, *11*(1), pp. 171-173.
- Borteiro, C., Verdes, J. M., Cruz, J. C., Sabalsagaray, M. J., Kolenc, F., Debat, C. M. and Ubilla, M. (2015b) 'Ichthyophonus sp.(Ichthyophonae, Ichthyophonida) infection in a South American amphibian, the hylid frog *Hypsiboas pulchellus*', *Journal of wildlife diseases*, *51*(2), pp. 530-533.
- Botkin, D. B., & Keller, E. A. (2010). *Environmental science: Earth as a living planet: Wiley Global Education*.
- Bozzano, H. R. (2018). Cuenca del Arroyo Maldonado: Información por polígono.
- Britson, C., & Threlkeld, S. (1998). Abundance, metamorphosis, developmental, and behavioral abnormalities in *Hyla chrysoscelis* tadpoles following exposure to three agrichemicals and methyl mercury in outdoor mesocosms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *61*(2), 154-161
- Brock, T. C. M., Bas, D. a., Belgers, J. D. M., Bibbe, L., Boerwinkel, M. C., Crum, S. J. H. Roessink, I. (2016). Effects of sediment-spiked lufenuron on benthic macroinvertebrates in outdoor microcosms and single-species toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, *177*, 464-475.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.021>
- Brodeur, J. C., Candiotti, J. V., Soloneski, S., Larramendy, M. L., & Ronco, A. E. (2012). Evidence of reduced feeding and oxidative stress in common tree frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an agroecosystem experiencing severe drought. *Journal of Herpetology*, *46*(1), 72-78. doi:10.1670/10-200.
- Brodeur, J., & Candiotti, J. V. (2017). Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: Potential biomonitor/bioindicator species for the Pampa region of Argentina. In *Ecotoxicology and Genotoxicology* (pp. 163-194).

- Brodeur, J. C., Poliserpi, M. B., & Sánchez, M. (2014). Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, *112*, 70-76.
- Brodeur, J. C., Suarez, R. P., Natale, G. S., Ronco, A. E., & Elena Zaccagnini, M. (2011). Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *74*(5), 1370-1380. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.04.024
- Brodeur, J. C., Svartz, G., Perez-Coll, C. S., Marino, D. J., & Herkovits, J. (2009). Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology*, *91*(2), 161-170.
- Brodeur, J. C., Vera Candioti, J., Soloneski, S., Larramendy, M. L., & Ronco, A. E. (2012). Evidence of reduced feeding and oxidative stress in common tree frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an agroecosystem experiencing severe drought. *Journal of Herpetology*, *46*(1), 72-78. doi:10.1670/10-200
- Brown, A., Martínez Ortiz, U., Acerbi, M., & Corcuera, J. F. (2006). La situación ambiental argentina 2005.
- Browne, R. K., Seratt, J., Vance, C., & Kouba, A. (2006). Hormonal priming, induction of ovulation and in-vitro fertilization of the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, *4*(1), 34.
- Bruce, A., & Davis, R. (1983). Utilization of Sewage Sludge in Agriculture. Maximizing Benefits and Minimizing Risks. Paper presented at the Proceeding of the International Symposium: Biological reclamation and land utilisation of urban wastes. Naples.
- Brühl, C. A., Schmidt, T., Pieper, S., & Alscher, A. (2013). Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? *Scientific Reports*, *3*, 1135.
- Brunelli, E., Bernabò, I., Berg, C., Lundstedt-Enkel, K., Bonacci, A., & Tripepi, S. (2009). Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology*, *91*(2), 135-142.
- Brunelli, E., Bernabò, I., Sperone, E., & Tripepi, S. (2010). Gill alterations as biomarkers of chronic exposure to endosulfan in *Bufo bufo* tadpoles. *Histology and histopathology*, *25*(10), 1519.
- Bryszewska, M. A., Sanz, E., Sanz-Landaluze, J., Muñoz-Olivas, R., Ortiz-Santaliestra, M. E., & Cámara, C. (2011). Evaluation of arsenic biotransformation by Iberian green frog during metamorphosis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *26*(1), 178-186.
- Brunetti, A. E., Merib, J., Carasek, E., Caramão, E. B., Barbará, J., Zini, C. A. and Faivovich, J. (2015) 'Frog volatile compounds: Application of in vivo SPME for the characterization of the odorous secretions from two species of *Hypsiboas* treefrogs', *Journal of chemical ecology*, *41*(4), pp. 360-372.
- Bryszewska, M. A., Sanz, E., Sanz-Landaluze, J., Muñoz-Olivas, R., Ortiz-Santaliestra, M. E. and Cámara, C. (2011) 'Evaluation of arsenic biotransformation by Iberian green frog during metamorphosis', *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *26*(1), pp. 178-186.

- Brühl, C. A., Schmidt, T., Pieper, S. and Alscher, A. (2013) 'Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline?', *Scientific Reports*, 3, pp. 1135.
- Burggren, W., & Warburton, S. (2005). Comparative developmental physiology: an interdisciplinary convergence. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 203-223.
- Burkhart, J. G., Ankley, G., Bell, H., Carpenter, H., Fort, D., Gardiner, D., Jepson, P. (2000). Strategies for assessing the implications of malformed frogs for environmental health. *Environmental Health Perspectives*, 108(1), 83-90.
- Burkart, R. (2005). Las áreas protegidas de la Argentina. *La situación ambiental Argentina*, 399-404.
- Burton, G. A., Batley, G. E., Chapman, P. M., Forbes, V. E., Smith, E. P., Reynoldson, T., Green, A. S. (2002). A weight-of-evidence framework for assessing sediment (or other) contamination: Improving certainty in the decision-making process. *Human and Ecological risk assessment*, 8(7), 1675-1696.
- Burton, G. A. J., Denton, D. L., Ho, K., & Ireland, D. S. (1995). Sediment toxicity testing issues and methods. In *Handbook of ecotoxicology* (pp. 111-150). Boca Raton, Florida: Lewis Publishers.
- Calevro, F., Campani, S., Ragghianti, M., Bucci, S., & Mancino, G. (1998). Tests of toxicity and teratogenicity in biphasic vertebrates treated with heavy metals (Cr 3+, Al 3+, Cd 2+). *Chemosphere*, 37(14), 3011-3017.
- Callery, E. M. (2006). There's more than one frog in the pond: A survey of the Amphibia and their contributions to developmental biology. *Seminars in cell & developmental biology*.
- Camargo, J. A., & Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment international*, 32(6), 831-849.
- Camilión, M. C., Manassero, M. J., Hurtado, M. a., & Ronco, A. E. (2003). Copper, lead and zinc distribution in soils and sediments of the south-western coast of the Río de la Plata estuary. *Journal of Soils and Sediments*, 3(3), 213-220. doi:10.1065/jss2003.04.073.
- Campiao, K. M., Morais, D. H., Dias, O. T., Aguiar, A., TOLEDO, G., Tavares, L. E. R. and Da Silva, R. J. (2014) 'Checklist of helminth parasites of amphibians from South America', *Zootaxa*, 3843(1), pp. 1-93.
- Canavero, A., Arim, M., Naya, D. E., Camargo, A., Da Rosa, I. and Maneyro, R. (2008) 'Calling activity patterns in an anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants', *North-Western Journal of Zoology*, 4(1).
- Candiotti, J. V., Natale, G. S., Soloneski, S., Ronco, A. E., & Larramendy, M. L. (2010). Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere*, 78(3), 249-255.
- Cannatella, D. (1999). Architecture: cranial and axial musculoskeleton. *Tadpoles: the biology of anuran larvae*, 52-91.
- Cappello, V., Fortunato, N., Tangorra, M., & Vergara, A. R. (2013). Plaguicidas en el territorio bonaerense: información toxicológica, ecotoxicológica y comportamiento ambiental. *Dirección Provincial de Recursos Naturales. Programa Gestión Ambiental En Agroecosistemas. Buenos Aires, 1.*

- Carabio, M., Perazza, G., Larrañaga, F. and Naya, D. E. (2017) 'The effect of food availability on phenotypic plasticity and phenotypic integration in the hylid frog *Hypsiboas pulchellus*', *Evolutionary Ecology Research*, 18(3), pp. 281-291.
- Carpenter, K. E. (1924). A study of the fauna of rivers polluted by lead mining in the Aberystwyth district of Cardiganshire. *Annals of Applied Biology*, 11(1), 1-23.
- Carriquiriborde, P., & Somoza, G. M. (2015). ¿Representan nuestros efluentes cloacales un riesgo para los ecosistemas acuáticos y la salud?
- Castañe, P. M., Salibian, A., Zylbersztejn, C., & Herkovits, J. (1987). Ontogenic screening of aldosterone in the South American toad *Bufo arenarum* (Hensel). *Comparative biochemistry and physiology. A. Comparative physiology*, 86(4), 697-701.
- Caswell, H. (1996). Demography Meets Ecotoxicology: Untangling the Population Level. *Ecotoxicology: A hierarchical treatment*, 2, 255
- Cei, J. M. (1980). *Amphibians of Argentina* (Vol. 2): Università degli Studi di Firenze..
- Chen, T. H., Gross, J. A., & Karasov, W. H. (2006). Sublethal effects of lead on northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. *Environmental toxicology and chemistry*, 25(5), 1383-1389.
- Chen, T. H., Gross, J. A., & Karasov, W. H. (2006). Sublethal effects of lead on northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. *Environmental toxicology and chemistry*, 25(5), 1383-1389.
- Chiesa, M. E., Rosenberg, C. E., Fink, N. E., & Salibián, A. (2006). Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae): Effects of sublethal lead acetate. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 50(3), 384-391.
- Cock, A. (1966). Genetical aspects of metrical growth and form in animals. *The Quarterly Review of Biology*, 41(2), 131-190.
- Collins, J. P., & Wilbur, H. M. (1979). Breeding habits and habitats of the amphibians of the Edwin S. George Reserve, Michigan, with notes on the local distribution of fishes.
- Collins, J. P., & Storfer, A. (2003). Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and distributions*, 9(2), 89-98.
- Collins, J. P., Crump, M. L., & Lovejoy III, T. E. (2009). *Extinction in our times: global amphibian decline*: Oxford University Press.
- Colombo, J. C., Khalil, M. F., Arnac, M., Horth, A. C., & Catoggio, J. A. (1990). Distribution of chlorinated pesticides and individual polychlorinated biphenyls in biotic and abiotic compartments of the Rio de La Plata, Argentina. *Environmental science & technology*, 24(4), 498-505.
- Cooke, A. (1981). Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 25(2), 123-133.
- Cooke, A. (1972). The effects of DDT, dieldrin and 2, 4-D on amphibian spawn and tadpoles. *Environmental Pollution (1970)*, 3(1), 51-68.
- Costa, C. S., Ronco, A., Trudeau, V., Marino, D., & Natale, G. (2018). Tadpoles of the horned frog *Ceratophrys ornata* exhibit high sensitivity to chlorpyrifos for conventional ecotoxicological and novel bioacoustic variables. *Environmental Pollution*, 235, 938-947.
- Croteau, M. C., Davidson, M. A., Lean, D., & Trudeau, V. (2008). Global increases in ultraviolet B radiation: potential impacts on amphibian development and metamorphosis. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(6), 743-761.

- Curi, L., Peltzer, P., Martinuzzi, C., Attademo, M., Seib, S., Simoniello, M., & Lajmanovich, R. (2017). Altered development, oxidative stress and DNA damage in *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) larvae exposed to poultry litter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *143*, 62-71.
- Curutchet, G., Grinberg, S., & Gutiérrez, R. A. (2012). Degradación ambiental y periferia urbana: un estudio transdisciplinario sobre la contaminación en la región metropolitana de Buenos Aires. *Ambiente & sociedade*, *15*(2), 173-194.
- Côté, R. P. (1976). The effects of petroleum refinery liquid wastes on aquatic life, with special emphasis on the Canadian environment. *National Research Council of Canada*, 15021.
- Dagle, J. M., Sabel, J. L., Littig, J. L., Sutherland, L. B., Kolker, S. J., & Weeks, D. L. (2003). Pitx2c attenuation results in cardiac defects and abnormalities of intestinal orientation in developing *Xenopus laevis*. *Developmental biology*, *262*(2), 268-281.
- D'ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., & Samperi, R. (2003). Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of the Total Environment*, *302*(1-3), 199-209.
- Da Rosa, I., Canavero, A., Maneyro, R., & Camargo, A. (2011). Trophic niche variation and individual specialization in *Hypsiboas pulchellus* (Duméril and Bibron, 1841)(Anura, Hylidae) from Uruguay. *South American Journal of Herpetology*, *6*(2), 98-107.
- da Silva, A. P. A., de Oliveira, C. D. L., Quirino, A. M. S., da Silva, F. D. M., de Aquino Saraiva, R., & Silva-Cavalcanti, J. S. (2018). Endocrine Disruptors in Aquatic Environment: Effects and Consequences on the Biodiversity of Fish and Amphibian Species. *Aquatic Science and Technology*, *6*(1), 35-51.
- Daley, J. M., Paterson, G., & Drouillard, K. G. (2014). Bioamplification as a bioaccumulation mechanism for persistent organic pollutants (POPs) in wildlife. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 227* (pp. 107-155): Springer.
- Daniels, W. M. (1998). *The distribution and fate of micro-organic contaminants in riverine sediments*. University of Reading,
- Daniels, W., House, W., Rae, J., & Parker, A. (2000). The distribution of micro-organic contaminants in river bed-sediment cores. *Science of the Total Environment*, *253*(1-3), 81-92.
- De Arcaute, C. R., Pérez-Iglesias, J., Nikoloff, N., Natale, G., Soloneski, S., & Larramendy, M. (2014a). Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators*, *45*, 632-639.
- De Arcaute, C. R., Pérez-Iglesias, J. M., Nikoloff, N., Natale, G. S., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2014b). Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological indicators*, *45*, 632-639.
- De Lapuente, J., González-Linares, J., Pique, E., & Borràs, M. (2014). Ecotoxicological impact of MSW landfills: assessment of teratogenic effects by means of an adapted FETAX assay. *Ecotoxicology*, *23*(1), 102-106.

- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., & Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6), 442-448.
- Del Conte, E., & Sirlin, J. L. (1952). Pattern series of the first embryonary stages in *Bufo arenarum*. *The Anatomical Record*, 112(1), 125-135.
- Demichelis, S., De La Torre, F., Ferrari, L., Garcia, M., & Salibian, A. (2001). Tadpoles assay: Its application to a water toxicity assessment of a polluted urban river. *Environmental monitoring and assessment*, 68(1), 63-73.
- Denoël, M., Libon, S., Kestemont, P., Brasseur, C., Focant, J.-F., & De Pauw, E. (2013). Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: a video-tracking analysis in larval amphibians. *Chemosphere*, 90(3), 945-951.
- Devi, N. N., & Gupta, A. (2013). Toxicity of endosulfan to tadpoles of *Fejervarya* spp.(Anura: Dicroglossidae): mortality and morphological deformities. *Ecotoxicology*, 22(9), 1395-1402
- Devine, G. J., & Furlong, M. J. (2007). Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human values*, 24(3), 281-306. 281-306. doi:10.1007/s10460-007-9067-z
- DeWitt, T. J., & Scheiner, S. M. (2004). *Phenotypic plasticity: functional and conceptual approaches*: Oxford University Press.
- Distel, C. A., & Boone, M. D. (2009). Effects of aquatic exposure to the insecticide carbaryl and density on aquatic and terrestrial growth and survival in American toads. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(9), 1963-1969.
- Doudoroff, P., Anderson, B., Burdick, G., Galtsoff, P., Hart, W., Patrick, R., Van Horn, W. (1951). Bio-assay methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. *Sewage and industrial wastes*, 1380-1397.
- Drake, D. L., Altig, R., Grace, J. B., & Walls, S. C. (2007). Occurrence of oral deformities in larval anurans. *Copeia*, 2007(2), 449-458.
- Dumont, J. N., Schultz, T. W., Buchanan, M. V., & Kao, G. L. (1983). Frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX)—A short-term assay applicable to complex environmental mixtures. In *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures III* 393-405
- Echeverría, D. D. (1990). Organogénesis y ciclos estacionales del órgano de Bidder en las larvas y los juveniles de *Bufo arenarum* (Anura: bufonidae). *Cuadernos de Herpetología*, 5.
- Edginton, A. N., Rouleau, C., Stephenson, G. R., & Boermans, H. J. (2007). 2, 4-D butoxyethyl ester kinetics in embryos of *Xenopus laevis*: the role of the embryonic jelly coat in reducing chemical absorption. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 52(1), 113-120.
- Egea-Serrano, A., Tejedó, M., & Torralva, M. (2009). Populational divergence in the impact of three nitrogenous compounds and their combination on larvae of the frog *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885). *Chemosphere*, 76(7), 869-877.
- Egea-Serrano, A., Tejedó, M. and Torralva, M. (2011) 'Behavioral responses of the Iberian waterfrog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), to three nitrogenous compounds in laboratory conditions', *Ecotoxicology*, 20(6), pp. 1246-1257.
- Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P., & Ronco, A. E. (2013). Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. *International Journal of Environment and Health*, 6(4), 330-339.

- Ellinger, M. S. (1980). Genetic and experimental studies on a pigment mutation, Pale (Pa), in the frog, *Bombina orientalis*. *Development*, 56(1), 125-137.
- Elsdale, T., Pearson, M., & Whitehead, M. (1976). Abnormalities in somite segmentation following heat shock to *Xenopus* embryos. *Development*, 35(3), 625-635.
- Emerson, H., & Norris, C. (1905). "Red-leg"—An infectious disease of frogs. *Journal of Experimental Medicine*, 7(1), 32-58.
- Environment, C. C. o. M. o. t. (2002) *Canadian environmental quality guidelines*. Canadian Council of Ministers of the Environment.
- EPA, U. (1986). *Quality criteria for water 1986*.
- EPA., U. (2001). Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses: Technical manual. In: US Environmental Protection Agency Washington DC.
- EPS, E. P. S. (1997). *Biological test method: Test for survival and growth in sediment using the freshwater amphipod Hyalella azteca*. Retrieved from
- Erickson, M. J., Turner, C. L., & Thibodeaux, L. J. (2005). Field observation and modeling of dissolved fraction sediment– water exchange coefficients for PCBs in the Hudson River. *Environmental science & technology*, 39(2), 549-556.
- Etkin, W., & Gona, A. (1967). Antagonism between prolactin and thyroid hormone in amphibian development. *Journal of Experimental Zoology*, 165(2), 249-258.
- Faivovich, J., Garcia, P. C., Ananias, F., Lanari, L., Basso, N. G. and Wheeler, W. C. (2004) 'A molecular perspective on the phylogeny of the Hyla pulchella species group (Anura, Hylidae)', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(3), pp. 938-950.
- FAO, I., & PNUMA, I. (1999). El futuro de nuestra tierra, enfrentando el desafío guía para la planificación integrada para el desarrollo sostenible de los recursos de la tierra. *Roma, Italia*.
- Fellers, G. M., Green, D. E., & Longcore, J. E. (2001). Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia*, 2001(4), 945-953.
- Fernández, K. (1927). Sobre la biología y reproducción de batracios argentinos. Segunda parte. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba*, 29, 271-328.
- Fernández, F. J., Moreira, G., Ferraro, D. and De Santis, L. (2009) 'Presas consumidas por la Lechuza de Campanario (*Tyto alba*) en la localidad de Olavarría, Buenos Aires: un caso de elevada batracofagia', *Nuestras Aves*, 54(1), pp. 20-21.
- Ferrari, A., Anguiano, L., Lascano, C., Sotomayor, V., Rosenbaum, E., & Venturino, A. (2008). Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad *Bufo arenarum*: Differential responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 22(4), 259-267.
- Ferrari, L., & Salibian, A. (1999). Effect of cadmium on the epidermic structure of *Bufo arenarum* tadpoles: influence of the chemical composition of the incubation media. *Archives of physiology and biochemistry*, 107(2), 91-96.
- Filipello, A. M., & Echeverría, D. D. (1990). Edad y crecimiento en *Bufo arenarum* (Anura: bufonidae). *Cuadernos de Herpetología*, 5.
- Finney, D. J. (1952). Statistical method in biological assay. *Statistical method in biological assay*.

- Forbes, T. (1993). *Ecotoxicology in theory and practice: Springer Science & Business Media*.
- Fort, D. J., Propst, T. L., Stover, E. L., Helgen, J. C., Levey, R. B., Gallagher, K., & Burkhart, J. G. (1999). Effects of pond water, sediment, and sediment extracts from Minnesota and Vermont, USA, on early development and metamorphosis of *Xenopus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(10), 2305-2315.
- Fort, D. J., Rogers, R. L., Paul, R. R., Miller, M. F., Clark, P., Stover, E. L., Reed, K. L. (2001). Effects of pond water, sediment and sediment extract samples from New Hampshire, USA on early *Xenopus* development and metamorphosis: comparison to native species. *Journal of Applied Toxicology*, 21(3), 199-209.
- Fort, D. J., Rogers, R. L., McLaughlin, D. W., Sellers, C. M., & Schlekot, C. L. (2002). Impact of boron deficiency on *Xenopus laevis*. *Biological trace element research*, 90(1-3), 117-142.
- Francis, P. C., Birge, W. J., & Black, J. A. (1984). Effects of cadmium-enriched sediment on fish and amphibian embryo-larval stages. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8(4), 378-387.
- Frassetto, A., Daniele, C., Somma, D., & Bachmann, L. (2005). Los corredores ecológicos de Argentina. *Situación ambiental Argentina*, 404-408.
- Gallardo, J. M. (1987). *Anfibios Argentinos: Guía para su identificación*: Librería Agropecuaria.
- Gans, C. (1985). Vertebrate morphology: Tale of a phoenix. *American zoologist*, 25(3), 689-694.
- García-Muñoz, E., Guerrero, F., & Parra, G. (2009). Effects of copper sulfate on growth, development, and escape behavior in *Epidalea calamita* embryos and larvae. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 56(3), 557.
- García-Muñoz, E., Guerrero, F., & Parra, G. (2011). Larval escape behavior in anuran amphibians as a wetland rapid pollution biomarker. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 44(2), 109-123.
- Gasparri, N., & Grau, H. (2005). Patrones regionales de deforestación en el subtrópico argentino y su contexto ecológico y socioeconómico. *Situación Ambiental Argentina*, 442-446.
- Giesy, J. P. and Robert, A. H. (1989) 'Freshwater sediment toxicity bioassessment: Rationale for species selection and test design', 15(4), pp. 539-569.
- Gilbert, S. F., & Epel, D. (2009). Ecological developmental biology: integrating epigenetics, medicine, and evolution. Giesy, J. P., & Robert, A. H. (1989). Freshwater sediment toxicity bioassessment: Rationale for species selection and test design. 15(4), 539-569. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0380-1330\(89\)71510-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0380-1330(89)71510-0)
- Giusto, A., & Ferrari, L. (2008). Copper toxicity on juveniles of *Hyaella pseudoazteca* Gonzalez and Watling, 2003. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(2), 169-173. doi:10.1007/s00128-008-9463-0
- Grapentine, L., Anderson, J., Boyd, D., Burton, G. A., DeBarros, C., Johnson, G., Pascoe, T. (2002). A decision making framework for sediment assessment developed for the Great Lakes. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8(7), 1641-1655.
- Grau, H. and Aide, M. (2008) 'Globalization and land-use transitions in Latin America', *Ecology and Society*, 13(2), pp. 16.

- Greulich, K., & Pflugmacher, S. (2003). Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology*, 65(3), 329-336.
- Goldberg, F. J. (2015). Un caso de gónada segmentada en renacuajos de *Hypsiboas riojanus* (Anura, Hylidae).
- Goleman, W. L., Carr, J. A., & Anderson, T. A. (2002). Environmentally relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit thyroid function and alter sex ratios in developing *Xenopus laevis*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(3), 590-597.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
- Govindarajulu, P. P., & Anholt, B. R. (2006). Interaction between biotic and abiotic factors determines tadpole survival rate under natural conditions. *Ecoscience*, 13(3), 413-421.
- Grau, H., & Aide, M. (2008). Globalization and land-use transitions in Latin America. *Ecology and Society*, 13(2), 16.
- Griffis-Kyle, K. L., & Ritchie, M. E. (2007). Amphibian survival, growth and development in response to mineral nitrogen exposure and predator cues in the field: an experimental approach. *Oecologia*, 152(4), 633-642.
- Grooten, M., & Almond, R. (2018). Informe Planeta Vivo 2018: apuntando más alto. *WWF*.
- Gutleb, A. C., Appelman, J., Bronkhorst, M. C., Van den Berg, J. H. J., Spenkelink, A., Brouwer, A., & Murk, A. J. (1999). Delayed effects of pre-and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 8(1), 1-14.
- Guzy, J. C., McCoy, E. D., Deyle, A. C., Gonzalez, S. M., Halstead, N., & Mushinsky, H. R. (2012). Urbanization interferes with the use of amphibians as indicators of ecological integrity of wetlands. *Journal of Applied Ecology*, 49(4), 941-952.
- Haas, A. (2001). Mandibular arch musculature of anuran tadpoles, with comments on homologies of amphibian jaw muscles. *Journal of Morphology*, 247(1), 1-33.
- Haas, A. (2003). Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia: Anura)★. *Cladistics*, 19(1), 23-89.
- Haas, A., & Richards, S. J. (1998). Correlations of cranial morphology, ecology, and evolution in Australian suctorial tadpoles of the genera *Litoria* and *Nyctimystes* (Amphibia: Anura: Hylidae: Pelodyadinae). *Journal of Morphology*, 238(2), 109-141.
- Harris, M., Chora, L., Bishop, C., & Bogart, J. (2000). Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(2), 263-270.
- Habaeva, Z., Gazzaeva, R., Badtiev, A., & Gagloeva, M. (2016). Impact of uv radiation on amphibians animals. *Modern Science Success*.
- Harris, M. L., Bishop, C. A., Struger, J., Ripley, B., & Bogart, J. P. (1998). The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) populations in orchard wetlands. II. Effects of pesticides and eutrophic conditions on early life stage development. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(7), 1351-1363.
- Harris, M. L., Chora, L., Bishop, C. A., & Bogart, J. P. (2000). Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana*

- pipiens, and Bufo americanus. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 64(2).
- Hatch, A., & Blaustein, A. (2000). Combined effects of UV-B, nitrate, and low pH reduce the survival and activity level of larval Cascades frogs (*Rana cascadae*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(4), 494-499.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., . . . Parker, J. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), 40-50.
- Haywood, L. K., Alexander, G. J., Byrne, M. J., & Cukrowska, E. (2004). *Xenopus laevis* embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium. *African Zoology*, 39(2), 163-174.
- Henle, K. (2014). Anomalies in natural populations of amphibians: overview, patterns and causes, methodological recommendation. *Anomalii i Patologii Amfibii i Reptilii.—Ekaterinburg (Uralskii Federalnii Univ.)*, 183-190.
- Henle, K., & Dubois, A. (2017). Studies on Anomalies in Natural Populations of Amphibians. *Mertensiella*, 25, 185-242.
- Herkovits, J. (1977). Are shape and morphogenesis independent phenomena? *Experientia*, 33(4), 510-513.
- Herkovits, J. and Pérez-Coll, C. (1991) 'Antagonism and synergism between lead and zinc in amphibian larvae', *Environmental Pollution*, 69(2-3), pp. 217-221.
- Herkovits, J. and Pérez Coll, C. S. (1993) 'Stage dependent susceptibility of Bufo arenarum embryos to cadmium', *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 50(4), pp. 608-611.
- Herkovits, J. and Helguero, L. A. (1998) 'Copper toxicity and copper–zinc interactions in amphibian embryos', *Science of the total environment*, 221(1), pp. 1-10.
- Herkovits, J., & Pérez-Coll, C. (1999). Bioassays for toxicity test with amphibian embryos (“ANFITOX”). *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 42, 24-30.
- Herkovits, J., Perez-Coll, C. and Herkovits, F. D. (2002) 'Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX)', *Environmental pollution*, 116(1), pp. 177-183.
- Herkovits, J. and Perez-Coll, C. S. (2003) 'AMPHITOX: a customized set of toxicity tests employing amphibian embryos', *Multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations*: ASTM International.
- Heyer, W. R. (1994). Variation within the *Leptodactylus podicipinus-wagneri* complex of frogs (Amphibia: Leptodactylidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*.
- Hill, M. K. (2010) *Understanding environmental pollution*. Cambridge University Press.
- Hojman, J. Y., Meichtry, J. M., Litter, M. I. and Coll, C. S. P. (2015) 'Abatement of toxicity of effluents containing Cr (VI) by heterogeneous photocatalysis. Toxicity assessment by AMPHITOX assay', *Ecotoxicology and environmental safety*, 122, pp. 545-550.
- Hoke, R. A., & Ankley, G. T. (2005). Application of frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* to ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(10), 2677-2690.
- Hood, R. D. (2005). *Developmental and reproductive toxicology: a practical approach*: CRC press.

- Holt, E., & Miller, S. (2011). Bioindicators: Using Organisms to Measure.
- Hopkins, W. A., Congdon, J., & Ray, J. K. (2000). Incidence and impact of axial malformations in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*) developing in sites polluted by a coal-burning power plant. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(4), 862-868.
- Hopkins, W. A. (2007) 'Amphibians as models for studying environmental change', *Ilar Journal*, 48(3), pp. 270-277.
- Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H., & Kuzmin, S. L. (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404(6779), 752.
- Hoyos, J. M., Sánchez-Villagra, M. R., Carlini, A. A. and Mitgutsch, C. (2012) 'Skeletal development and adult osteology of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae)', *Acta Herpetologica*, 7(1), pp. 119.
- Howe, C. M., Berrill, M., Pauli, B. D., Helbing, C. C., Werry, K., & Veldhoen, N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(8), 1928-1938.
- Huey, D. W., & Beitinger, T. L. (1980). Hematological responses of larval *Rana catesbeiana* to sublethal nitrite exposures. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 25(1), 574-577.
- Hurtado, M. A., Giménez, J. E. and Cabral, M. G. (2006) 'Análisis ambiental del partido de La Plata: Aportes al ordenamiento territorial', *Buenos Aires: Consejo Federal de Inversiones*.
- Husain, I. A., Alkhatib, M. a. F., Jammi, M. S., Mirghani, M. E., Zainudin, Z. B. and Hoda, A. (2014) 'Problems, control, and treatment of fat, oil, and grease (FOG): a review', *Journal of oleo science*, pp. 13182.
- IADC/CEDA, 1997. Guide 2 – Conventions, Codes and Conditions, Marine Disposal and Land Disposal. International Association of Dredging Companies/Central Dredging Association.
- Ingersoll, C. G., Brunson, E. L., Dwyer, F. J., Ankley, G. T., Benoit, D. A., Norberg-King, T. J., Winger, P. V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(11), 1885-1894.
- IRAM, (2003). Norma Argentina, Calidad ambiental y Calidad del agua de muestreo. Parte 16: *Guía para el bioensayo de muestras*. IRAM 29012-16:2003.
- IUCN, U. (2017) 'WWF (1980) World conservation strategy', *World Conservation Union, United Nations Environment Programme, World Wide Fund for Nature, Gland*, pp. 202-216.
- Johansson, M., Primmer, C. R., & Merilä, J. (2007). Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology*, 16(13), 2693-2700.
- Johnson, P. T., Lunde, K. B., Ritchie, E. G., & Launer, A. E. (1999). The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science*, 284(5415), 802-804
- Johnson, P. T., Lunde, K. B., Haight, R. W., Bowerman, J., & Blaustein, A. R. (2001). *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda: Digenea) infection induces severe limb malformations in western toads (*Bufo boreas*). *Canadian Journal of Zoology*, 79(3).

- Johnson, P. T., Lunde, K. B., Thurman, E. M., Ritchie, E. G., Wray, S. N., Sutherland, D. R., . . . Blaustein, A. R. (2002). Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs*, 72(2), 151-168.
- Johnson, P. T., Reeves, M. K., Krest, S. K., & Pinkney, A. E. (2010). A decade of deformities: advances in our understanding of amphibian malformations and their implications. In *Ecotoxicology of amphibians and reptiles* (pp. 524-549): CRC Press.
- Johnson, M. S., Aubee, C., Salice, C. J., Leigh, K. B., Liu, E., Pott, U., & Pillard, D. (2017). A review of ecological risk assessment methods for amphibians: comparative assessment of testing methodologies and available data. *Integrated environmental assessment and management*, 13(4), 601-613.
- Jordan, M., Meyer, W. B., Kates, R. W., Clark, W. C., Richards, J. F., Turner, B. L. and Mathews, J. T. (1990) *The earth as transformed by human action: global and regional changes in the biosphere over the past 300 years*. CUP Archive.
- Junges, C. M., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M. and Bassó, A. (2010) 'Predator-prey interactions between *Synbranchus marmoratus* (Teleostei: Synbranchidae) and *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Amphibia: Hylidae): Importance of lateral line in nocturnal predation and effects of fenitrothion exposure', *Chemosphere*, 81(10), pp. 1233-1238.
- Junges, C. M., Vidal, E. E., Attademo, A. M., Mariani, M. L., Cardell, L., Negro, A. C., Cassano, A., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C. and Zalazar, C. S. (2013) 'Effectiveness evaluation of glyphosate oxidation employing the H₂O₂/UVC process: toxicity assays with *Vibrio fischeri* and *Rhinella arenarum* tadpoles', *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(3), pp. 163-170.
- Junges, C. M., Maglianese, M., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P., & Attademo, A. M. (2017). Acute toxicity and etho-toxicity of three insecticides used for mosquito control on amphibian tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(4), 143.
- Kadokaru, S., Tamukai, K.-i., Tominaga, A., Goka, K., & Une, Y. (2015). Spontaneous oral chytridiomycosis in wild bullfrog tadpoles in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 15-0486.
- Kamaraj, B., & Purohit, R. (2014). Mutational analysis of oculocutaneous albinism: a compact review. *BioMed research international*, 2014.
- Karickhoff, S. W. (1984). Organic pollutant sorption in aquatic systems. *Journal of hydraulic engineering*, 110(6), 707-735.
- Kehr, A. (1989). Factores dependientes de la densidad y su influencia sobre el crecimiento individual de los estados larvales de *Hyla pulchella pulchella* (Amphibia: Anura). *Limnobiós*, 2(10), 757-761.
- Kehr, A. I. (1987). Crecimiento individual de larvas de *Hyla pulchella pulchella* y *Bufo fernandezae* en condiciones controladas de coexistencia y densidad (Amphibia: anura). *Cuadernos de Herpetología*, 3.
- Keller, R., Davidson, L. A., & Shook, D. R. (2003). How we are shaped: the biomechanics of gastrulation. *Differentiation: ORIGINAL ARTICLE*, 71(3), 171-205.
- Kerby, J. L., Richards-Hrdlicka, K. L., Storfer, A., & Skelly, D. K. (2010). An examination of amphibian sensitivity to environmental contaminants: are amphibians poor canaries? *Ecology letters*, 13(1), 60-67.

- Krishnamurthy, S., & Smith, G. (2011). Combined effects of malathion and nitrate on early growth, abnormalities, and mortality of wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. *Ecotoxicology*, 20(6), 1361-1367.
- Kinney, C. A., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Burkhardt, M. R., Werner, S. L., Cahill, J. D. and Jorgensen, G. R. (2006) 'Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application', *Environmental science & technology*, 40(23), pp. 7207-7215.
- Klein, W. (1989) '3.1 Mobility of environmental chemicals, including abiotic degradation', *Ecology and Climate: John Wiley & Sons: New York*.
- Knapp, R. A., & Morgan, J. A. (2006). Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. *Copeia*, 2006(2), 188-197.
- Koestler, A. (1991) 'Holons and hierarchy theory', *From Gaia to Selfish Genes: Selected Writings in the Life Sciences*, edited by Connie Barlow, pp. 87-1.
- Kolenc, F., Borteiro, C., Alcalde, L., Baldo, D., Cardozo, D. and Faivovich, J. (2008) 'Comparative larval morphology of eight species of *Hypsiboas* Wagler (Amphibia, Anura, Hylidae) from Argentina and Uruguay, with a review of the larvae of this genus', *Zootaxa*, (1927), pp. 1.
- Kouba, A. J., Vance, C. K., Milam, C. and Carr, M. (2012) 'A comparison of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone releasing hormone on the induction of spermiation and amplexus in the American toad (*Anaxyrus americanus*)', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), pp. 59.
- Kubitz, j. A., Besser, J. M., & Giesy, J. P. (1996). A two step experimental design for a sediment bioassay using growth of amphipod *Hyaella azteca* for the test endpoint. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(10), 1783–1792.
- Kuzmin, S. (1994) 'The problem of declining amphibian populations in the Commonwealth of Independent States and adjacent territories', *Alytes*, 12(3), pp. 123-134.
- Labunska, I., Brigden, K. and Stringer, R. (2000) 'Contaminantes orgánicos y metales pesados en sedimentos y muestras de agua asociados con el Polo Petroquímico de Ensenada-Berisso, Argentina, 2000', *Contaminantes orgánicos y metales pesados en sedimentos y muestras de agua asociados con el Polo Petroquímico de Ensenada-Berisso, Argentina, 2000*: Greenpeace.
- Lajmanovich, R. C., Sandoval, M., & Peltzer, P. M. (2003). Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(3), 612-618.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna, M., Peltzer, P. M., Stringhini, G. A., & Attademo, A. M. (2005). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1-2), 67-72.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Junges, C. M. (2012). Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Química Viva*, 11(3), 184-198.
- Landrum, P. F., & Robbins, J. A. (1990). Bioavailability of sediment-associated contaminants to benthic invertebrates. In *Sediments: chemistry and toxicity of in-place pollutants* (pp. 237-263). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Lannoo, M. (2008). *Malformed frogs: the collapse of aquatic ecosystems*: Univ of California Press.

- Lannoo, M. J. (2009). Amphibian malformations. *Amphibian biology*, 8, 3089-3111.
- Lascano, C. I., Sotomayor, V., Ferrari, A., & Venturino, A. (2009). Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta toxicol. argent*, 17(1), 8-19.
- Lasier, P. J., Urich, M. L., Hassan, S. M., Jacobs, W. N., Bringolf, R. B. and Owens, K. M. (2016) 'Changing agricultural practices: potential consequences to aquatic organisms', *Environmental Monitoring and Assessment*, 188, pp. 672.
- Laufer, G., Canavero, A., Núñez, D. and Maneyro, R. (2008) 'Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay', *Biological Invasions*, 10(7), pp. 1183-1189.
- Lavilla, E. O., & Rouges, M. (2004). Reproducción y desarrollo en anuros argentinos. *Sistemática y filogenia de los vertebrados*, 159.
- Lefcort, H., Hancock, K., Maur, K., & Rostal, D. (1997). The effects of used motor oil, silt, and the water mold *Saprolegnia parasitica* on the growth and survival of mole salamanders (Genus *Ambystoma*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32(4), 383-388
- Lenkowski, J. R., Reed, J. M., Deininger, L., & McLaughlin, K. A. (2008). Perturbation of organogenesis by the herbicide atrazine in the amphibian *Xenopus laevis*. *Environmental Health Perspectives*, 116(2), 223.
- Lenkowski, J. R., Sanchez-Bravo, G., & McLaughlin, K. A. (2010). Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *Journal of Environmental Sciences*, 22(9), 1305-1308.
- Lewis, R. A. (1998) *Lewis' dictionary of toxicology*. CRC press.
- Licht, P. (1979) 'Reproductive endocrinology of reptiles and amphibians: gonadotropins', *Annual review of physiology*, 41(1), pp. 337-351.
- Licht, P. and Porter, D. A. (1987) 'Role of gonadotropin-releasing hormone in regulation of gonadotropin secretion from amphibian and reptilian pituitaries', *Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles*: Springer, pp. 61-85.
- Liendro, N., Ferrari, A., Mardirosian, M., Lascano, C. I., & Venturino, A. (2015). Toxicity of the insecticide chlorpyrifos to the South American toad *Rhinella arenarum* at larval developmental stage. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39(2), 525-535.
- Linder, G., Lehman, C. M. and Bidwell, J. R. (2010) 'Ecotoxicology of amphibians and reptiles in a nutshell', *Ecotoxicology of amphibians and reptiles. 2nd edition. SETAC Press, Pensacola Florida*, pp. 69-104.
- Liu, J., Cao, Q., Yuan, J., Zhang, X., Yu, L., & Shi, H. (2012). Histological observation on unique phenotypes of malformation induced in *Xenopus tropicalis* larvae by tributyltin. *Journal of Environmental Sciences*, 24(2), 195-202.
- Lombardo, I., Carreira, S. and Maneyro, R. (2016) 'Hypsiboas pulchellus (Montevideo Treefrog). Multiple Amplexus', *Herpetological Review*, 47(1), pp. 111.
- Lopez, J. A., Scarabotti, P. A. and Ghirardi, R. (2015) 'Amphibian trophic ecology in increasingly human-altered wetlands'.
- Lotz, B. (2009) *GM-related sustainability: Agro-ecological impacts, risks and opportunities of soy production in Argentina and Brazil*, Wageningen: Plant Research International B.V.259).
- Loman, J. (2016). Breeding phenology in *Rana temporaria*. Local variation is due to pond temperature and population size. *Ecology and evolution*, 6(17), 6202-6209.

- Lunde, K. B., & Johnson, P. T. (2012). A practical guide for the study of malformed amphibians and their causes. *Journal of Herpetology*, 46(4), 429-442.
- Luo, S.-Q., Plowman, M., Hopfer, S., & Sunderman, F. (1993). Embryotoxicity and teratogenicity of Cu²⁺ and Zn²⁺ for *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 23(2), 111-120.
- MAA (2006) *Ministerio de Asuntos Agrarios. Informe de avance del censo hortiflorícola de la provincia de Buenos Aires*. Buenos Aires: Subsecretaría de Agricultura y Ganadería. Available at:
<http://www.estadistica.ec.gba.gov.ar/dpe/Estadistica/chfba/censohort.htm>
- Mac Loughlin, T. M., Peluso, L. and Marino, D. J. G. (2017) 'Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina', *Science of the Total Environment*, 598, pp. 572-580.
- Manahan, S. E. (2011). *Fundamentals of environmental chemistry*: CRC press.
- Mann, J. (1999). *Tadpoles: the biology of anuran larvae*: University of Chicago Press.
- Manassero, M., Camilión, C. and Ronco, A. (2004) 'Análisis textural de sedimentos fluviales distales de arroyos de la Pampa Ondulada, Provincia de Buenos Aires, Argentina', *Latin American Journal of Sedimentology and Basin Analysis*, 11(2), pp. 57-68.
- Marantelli, G., Berger, L., Speare, R., & Keegan, L. (2004). Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pacific Conservation Biology*, 10(3), 173-179.
- Markert, B. A., Breure, A. M., & Zechmeister, H. G. (2003). *Bioindicators and biomonitors* (Vol. 6): Elsevier.
- Mathieu-Denoncourt, J., Martyniuk, C. J., de Solla, S. R., Balakrishnan, V. K., & Langlois, V. S. (2014). Sediment contaminated with the azo dye disperse yellow 7 alters cellular stress-and androgen-related transcription in *Silurana tropicalis* larvae. *Environmental science & technology*, 48(5), 2952-2961.
- Matisoff, G., & Wang, X. (1998). Solute transport in sediments by freshwater infaunal bioirrigators. *Limnology and Oceanography*, 43(7), 1487-1499.
- Mattison, C. (1987) *Care of reptiles and amphibians in captivity*. Blandford Press.
- McDaniel, T. V., Harris, M. L., Bishop, C. A., & Struger, J. (2004). Development and survivorship of northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) exposed to contaminants in the water and sediments of the St. Lawrence River near Cornwall, Ontario. *Water Quality Research Journal*, 39(3), 160-174.
- McDiarmid, R. W., & Altig, R. (1999). *Tadpoles: the biology of anuran larvae*: University of Chicago Press.
- McKee, J. E. (1952) *Water quality criteria*. California Institute of Technology.
- McKee, J. E. and Wolf, H. W. (1963) 'Water quality criteria', *Water quality criteria*: State Water Quality Control Board.
- Medina, R. G., Ponssa, M. L., Guerra, C., & Aráoz, E. (2013). Amphibian abnormalities: Historical records of a museum collection in Tucuman Province, Argentina. *The Herpetological Journal*, 23(4), 193-193.
- Meteyer, C. U. (1997). Diagnostic Findings Associated with Malformed Frogs from Vermont Summer 1997. *USGS Biol. Resources Div. Investigation of Deformities in the Northern Leopard Frog*.
- Miller, D., Gray, M., & Storfer, A. (2011). Ecopathology of ranaviruses infecting amphibians. *Viruses*, 3(11), 2351-2373.

- Montenegro, C. (2012) 'Monitoreo de la Superficie de Bosque Nativo de la República Argentina Período 2006-2011 Regiones Forestales Parque Chaqueño, Selva Misionera y Selva Tucumano Boliviana', *Buenos Aires, Argentina: UMSEF-SADyDS*.
- Moody, S. A. (1987a). Fates of the blastomeres of the 16-cell stage *Xenopus* embryo. *Developmental biology*, 119(2), 560-578.
- Moody, S. A. (1987b). Fates of the blastomeres of the 32-cell-stage *Xenopus* embryo. *Developmental biology*, 122(2), 300-319.
- Moody, S. A., & Kline, M. J. (1990). Segregation of fate during cleavage of frog (*Xenopus laevis*) blastomeres. *Anatomy and embryology*, 182(4), 347-362.
- Moreira, L. F., Moura, R. G. and Maltchik, L. (2016) 'Stop and ask for directions: factors affecting anuran detection and occupancy in Pampa farmland ponds', *Ecological Research*, 31(1), pp. 65-74.
- Moriyama, Y., Ohata, Y., Mori, S., Matsukawa, S., Michiue, T., Asashima, M., & Kuroda, H. (2011). Rapamycin treatment causes developmental delay, pigmentation defects, and gastrointestinal malformation on *Xenopus* embryogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 404(4), 974-978.
- Munro, A. F. (1939). Nitrogen excretion and arginase activity during amphibian development. *Biochemical Journal*, 33(12), 1957.
- Mussi, M. A., & Calcaterra, N. B. (2010). Paraquat-induced oxidative stress response during amphibian early embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(2), 240-247.
- Nace, G. W. (1977) 'Breeding amphibians in captivity
- Natale, G. S. (2006) *Análisis ecotoxicológico de una comunidad de anuros de la Región Pampeana*. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- Natale, G. S., Ammassari, L. L., Basso, N. G. and Ronco, a. E. (2006) 'Acute and chronic effects of Cr(VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles', *Diseases of Aquatic Organisms*, 72(3), pp. 261-267.
- Natale, G. S. (2006). *Análisis ecotoxicológico de una comunidad de anuros de la Región Pampeana*. Facultad de Ciencias Naturales y Museo,
- Natale, G. S., Vera-Candioti, J., de Arcaute, C. R., Soloneski, S., Larramendy, M. L., & Ronco, A. E. (2018). Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 471-479.
- Natale G.S.; Bahl M.F.; Mc Carthy C.; Nicolosi Gelis M.M.; Bulus Rossini G.D.; Ronco A. E. "Sensibilidad de larvas de *Rhinella arenarum* a contaminantes ambientales" *XIV Congreso Argentino de Herpetología, Puerto Madryn, Chubut, Argentina, del 17 al 20 de Septiembre de 2013*
- Navarrete, M D. (2006) Análisis sistémico de la agriculturización en la pampa húmeda argentina y sus consecuencias en regiones extrapampeanas: sostenibilidad, brechas de conocimiento e integración de políticas. *United Nations Publications*.
- Newman, M. C., & Clements, W. H. (2007). *Ecotoxicology: a comprehensive treatment*: cRc Press.
- Newman, M. C. (2012). *Quantitative methods in ecotoxicology*. Boca Raton, Florida: CRC Press. .
- Nebeker, A. V., Cairns, M. a., Gakstatter, J. H., Malueg, K. W., Schuytema, G. S., & Krawczyk, D. F. (1984). Biological methods for determining toxicity of

- contaminated freshwater sediments to invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3(4), 617-630. doi:10.1002/etc.5620030412
- Nieuwkoop, P., & Faber, J. (1967). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. *Edition North-Holland Pub. Co.*
- Nikoloff, N., Natale, G. S., Marino, D., Soloneski, S. and Larramendy, M. L. (2014) 'Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae)', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100(1), pp. 275-281.
- Oberemm, A., Becker, J., Codd, G., & Steinberg, C. (1999). Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 14(1), 77-88.
- OECD (1993). *Guidelines for the Testing of Chemicals*. Ouellet, M. (2000). Amphibian deformities: current state of knowledge. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, 617-661.
- Olawoyin, R., Heidrich, B., Oyewole, S., Okareh, O. T. and McGlothlin, C. W. (2014) 'Chemometric analysis of ecological toxicants in petrochemical and industrial environments', *Chemosphere*, 112, pp. 114-119.
- Oliveira, S. V. (2008) 'Observação do comportamento predatório de *Chironius bicarinatus* (Serpentes, Colubridae) em *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae), Serra do sudeste, Rio Grande do Sul, Brasil', *Biodiversidade Pampeana*, 6(2).
- Ortiz-Santaliestra, M. E., & Sparling, D. W. (2007). Alteration of larval development and metamorphosis by nitrate and perchlorate in southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 53(4), 639-646.
- Osano, O., Admiraal, W., & Otieno, D. (2002). Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(2), 375-379.
- Ouellet, M. (2000). Amphibian deformities: current state of knowledge. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, 617-661.
- Paetow, L. J., McLaughlin, J. D., Cue, R. I., Pauli, B. D. and Marcogliese, D. J. (2012) 'Effects of herbicides and the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on the health of post-metamorphic northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*)', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, pp. 372-380.
- Palermo, P., Chaparro, M. A., Jurado, S., Bidegain, J. C. and Sinito, A. M. 'estudio magnético y de contaminación en sedimentos de canales de la plata'.
- Pandey, A. K., & Tomar, V. (1985). Melanophores in *Bufo melanostictus* (schneider) tadpoles following exposure to the insecticide dimethoate. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 35(1), 796-801.
- Park, C. J., Kang, H. S., & Gye, M. C. (2010). Effects of nonylphenol on early embryonic development, pigmentation and 3, 5, 3'-triiodothyronine-induced metamorphosis in *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura). *Chemosphere*, 81(10), 1292-1300.
- Park, C. J., Song, S. H., Kim, D. H., & Gye, M. C. (2017). Nickel affects gill and muscle development in oriental fire-bellied toad (*Bombina orientalis*) embryos. *Aquatic Toxicology*, 182, 67-78.

- Paruelo, J. M., Guerschman, J. P. and Verón, S. R. (2005) 'Expansión agrícola y cambios en el uso del suelo', *Ciencia hoy*, 15(87), pp. 14-23.
- Pazos, R. S., Bauer, D. E. and Gómez, N. (2018) 'Microplastics integrating the coastal planktonic community in the inner zone of the Río de la Plata estuary (South America)', *Environmental pollution*, 243, pp. 134-142.
- Pechmann, J. H. and Wilbur, H. M. (1994) 'Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts', *Herpetologica*, pp. 65-84.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sánchez-Hernandez, J. C., Cabagna, M. C., Attademo, A. M. and Bassó, A. (2008) 'Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(1), pp. 185-197.
- Peltzer, P. M., Junges, C. M., Attademo, A. M., Bassó, A., Grenón, P. and Lajmanovich, R. C. (2013a) 'Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide', *Ecotoxicology*, 22(7), pp. 1165-1173.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Repetti, M. R., Beldoménico, H. (2013). Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 142-151. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.09.010
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sanchez, L. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Bionda, C. L., Basso, A. (2011). Morphological abnormalities in amphibian populations. *Herpetological Conservation and Biology*, 6(3), 432-442.
- Peluso, M. L. (2011a) Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes. *Facultad de Ciencias Exactas*.
- Peluso, L., Giusto, A., Rossini, G. D. B., Ferrari, L., Salibián, A. and Ronco, A. E. (2011b) '*Hyaella curvispina* (amphipoda) as a test organism in laboratory toxicity testing of environmental samples', *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(2), pp. 372-376.
- Penny, C. and Adams, C. (1863) 'Report of experiments made upon fish, and of observations in connection with alleged pollution of the river Leven by discharges from the dyeworks at Leven-bank, Levenfield, Dillichip, and Dalmonock', *River Pollution Commission: Evidence. Correspondence and Reports*, 2(part 4), pp. 377-391.
- Persson, L. M., Breitholtz, M., Cousins, I. T., de Wit, C. A., MacLeod, M. and McLachlan, M. S. 2013. Confronting unknown planetary boundary threats from chemical pollution. ACS Publications.
- Perí, S. I. and Williams, J. D. (1988) 'Anomalías osteológicas en *Hyla pulcella pulcella* y *Pseudis paradoxus platensis* (Amphibia: anura)', *Boletín de la Asociación Herpetológica Argentina*, 4.
- Pérez Pardo, O. (2005) 'La desertificación en la República Argentina', *La situación ambiental argentina*, pp. 433-435.
- Pérez-Coll, C. S., Herkovits, J. and Salibian, A. (1985) 'Efectos del cadmio sobre el desarrollo de un anfibio', *Arch. Biol. Med. Exper*, 18, pp. 33-39.

- Pérez-Coll, C. S., Herkovits, J. and Salibián, A. (1988a) 'Embryotoxicity of lead on *Bufo arenarum*', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2), pp. 247-252.
- Pérez-Coll, C. S., Herkovits, J. and Salibián, A. (1988b) 'Embryotoxicity of lead on *Bufo arenarum*', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2), pp. 247-252.
- Pérez-Iglesias, J., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G. and Larramendy, M. (2015) 'Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on monteideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae)', *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, pp. 15-24.
- Pérez-Iglesias, J. M., Natale, G. S., Soloneski, S. and Larramendy, M. L. (2018) 'Are the damaging effects induced by the imazethapyr formulation Pivot® H in *Boana pulchella* (Anura) reversible upon ceasing exposure?', *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, pp. 1-10.
- Pérez-Iglesias, J. M., Ruiz de Arcaute, C., Natale, G. S., Soloneski, S. and Larramendy, M. L. (2017) 'Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III- and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae)', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142(May), pp. 503-508.
- Pérez-Iglesias, J. M., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G. S. and Larramendy, M. L. (2014) 'The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Monteideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae)', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, pp. 120-126.
- Pigliucci, M., Murren, C. J., & Schlichting, C. D. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology*, 209(12), 2362-2367.
- Paul, S. E., Andrés Laube, P., Pacheco Marino, S., Santamaría Martín, C., Moyano, D., Barbeito, C. G., & Méndez-Vilas, A. (2017). Morphological techniques used in ichthyopathological diagnosis.
- Plowman, M. C., Grbac-Ivankovic, S., Martin, J., Hopfer, S. M., & Sunderman Jr, F. W. (1994). Malformations persist after metamorphosis of *Xenopus laevis* tadpoles exposed to Ni²⁺, Co²⁺, or Cd²⁺ in FETAX assays. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 14(3), 135-144.
- Quintero, F. C., & De Dulce, B. (1996). DESCRIPCIÓN DE LAS ALTERACIONES DE EMBRIONES DE *Hyla labialis* EXPUESTOS A Hg²⁺, Cl⁻ Y NO₃. *Universitas Scientiarum*, 3(1-2), 41-52.
- Quintaneiro, C., Soares, A. M., & Monteiro, M. S. (2018). Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. *Chemosphere*, 194, 595-601.
- R Development Core Team. (2014). R: A language and environment for statistical computing. Retrieved from <http://www.R-project.org/>.
- Rand, G., Wells, P. and McCarty, L. (1995) 'Introduction to aquatic toxicology', *Fundamentals of aquatic toxicology effects, environmental fate, and risk assessment*. Taylor and Francis Publishers, North Palm Beach, Florida, USA, pp. 3-67.
- Read, J. (1997). Comparative abnormality rates of the trilling frog at Olympic Dam. *HERPETOFAUNA-SYDNEY*, 27, 23-27.

- Relyea, R. A. (2005). The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological applications*, 15(4), 1118-1124.
- Relyea, R. A., & Jones, D. K. (2009). The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(9), 2004-2008.
- Richardson, M. (1996) *Environmental xenobiotics*. CRC Press.
- Riley, E. P., & Vorhees, C. V. (2012). *Handbook of behavioral teratology*: Springer Science & Business Media.
- Riba, I., Casado-Martínez, C., Forja, J. M., & DelValls, A. (2004). Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(2), 271-282. doi:10.1897/03-146
- Rimoldi, F., Peluso, L., Rossini, G. B., Ronco, A. E. and Demetrio, P. M. (2018) 'Multidisciplinary approach to a study of water and bottom sediment quality of streams associated with mixed land uses: Case study Del Gato Stream, La Plata (Argentina)', *Ecological indicators*, 89, pp. 188-198
- Ringuelet, R. (2008) 'La complejidad de un campo social periurbano centrado en las zonas rurales de La Plata', *Mundo Agrario*, 9, pp. 1-20.
- Roberts, C., & Dickinson, T. (2012). *Ribeiroia ondatrae* causes limb abnormalities in a Canadian amphibian community. *Canadian Journal of Zoology*, 90(7), 808-814.
- Romansic, J. M., Waggener, A. A., Bancroft, B. A., & Blaustein, A. R. (2009). Influence of ultraviolet-B radiation on growth, prevalence of deformities, and susceptibility to predation in Cascades frog (*Rana cascadae*) larvae. *Hydrobiologia*, 624(1), 219-233.
- Ronco, A., Camilión, C. and Manassero, M. (2001) 'Geochemistry of heavy metals in bottom sediments from streams of the western coast of the Río de la Plata estuary, Argentina', *Environmental Geochemistry and Health*, 23(2), pp. 89-103.
- Ronco, A., Peluso, L., Jurado, M., Rossini, G. B. and Salibian, A. (2008) 'Screening of sediment pollution in tributaries from the southwestern coast of the Río de la Plata estuary', *Latin American journal of sedimentology and basin analysis*, 15(1), pp. 67-75.
- Rosenshield, M. L., Jofré, M. B., & Karasov, W. H. (1999). Effects of polychlorinated biphenyl 126 on green frog (*Rana clamitans*) and leopard frog (*Rana pipiens*) hatching success, development, and metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(11), 2478-2486.
- Rowe, Christopher, Kinney, O., Fiori, A., & Congdon, J. (1996). Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. *Freshwater Biology*, 36(3), 723-730.
- Rowe, C. L., Kinney, O. M., & Congdon, J. D. (1998). Oral deformities in tadpoles of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) caused by conditions in a polluted habitat. *Copeia*, 1998(1), 244-246.
- Ruiz, A. M., Maerz, J. C., Davis, A. K., Keel, M. K., Ferreira, A. R., Conroy, M. J., Fisk, A. T. (2010). Patterns of development and abnormalities among tadpoles in a constructed wetland receiving treated wastewater. *Environmental Science & Technology*, 44(13), 4862-4868.
- Ruiz de Arcaute, C., Salgado Costa, C., Demetrio, P. M., Natale, G. S., & Ronco, A. E. (2012). Influence of existing site contamination on sensitivity of *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae) tadpoles to Lorsban48E formulation of chlorpyrifos. *Ecotoxicology*, 21(8), 2338-2348. doi:10.1007/s10646-012-0990-4

- Sala, J. (1972) 'Contribución al estudio geohidrológico del Noreste de la Provincia de Buenos Aires', *EASNE-CFI. Serie. Téc*, 24.
- Salgado Costa, C. (2016) *Desarrollo de un modelo experimental con larvas de Ceratophrys spp. (Anura: Ceratophryidae) para su aplicación en estudios ecotoxicológicos de plaguicidas: efectos sobre variables convencionales y bioacústicas*. Facultad de Ciencias Naturales y Museo [Online] Available at: <http://hdl.handle.net/10915/52069> (Accessed).
- Salibián, A. (1992) 'Effects of deltamethrin on the South American toad, *Bufo arenarum*, tadpoles', *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 48(4), pp. 616-621.
- Sanchez, L. C., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Manzano, A. S., Junges, C. M. and Attademo, A. M. (2013) 'Reproductive activity of anurans in a dominant agricultural landscape from central-eastern Argentina', *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(3), pp. 912-926.
- Sansiñena, J. A., Peluso, L., Costa, C. S., Demetrio, P. M., Mac Loughlin, T. M., Marino, D. J., Natale, G. S. (2018). Evaluation of the toxicity of the sediments from an agroecosystem to two native species, *Hyaella curvispina* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) and *Boana pulchella* (AMPHIBIA: ANURA), as potential environmental indicators. *Ecological indicators*, 93, 100-110.
- Santucci, L., Carol, E., Borzi, G. and García, M. G. (2017) 'Hydrogeochemical and isotopic signature of surface and groundwater in a highly industrialized sector of the Rio de la Plata coastal plain (Argentina)', *Marine pollution bulletin*, 120(1-2), pp. 387-395.
- Sayim, F., & KAYA, U. (2006). Effects of dimethoate on tree frog (*Hyla arborea*) larvae. *Turkish Journal of Zoology*, 30(3), 261-266.
- Schmitt, S. M., Gull, M., & Brändli, A. W. (2014). Engineering *Xenopus* embryos for phenotypic drug discovery screening. *Advanced drug delivery reviews*, 69, 225-246.
- Schuch, a. P., Lipinski, V. M., Santos, M. B., Santos, C. P., Jardim, S. S., Cechin, S. Z. and Loreto, E. L. S. (2015) 'Molecular and sensory mechanisms to mitigate sunlight-induced DNA damage in treefrog tadpoles', *Journal of Experimental Biology*, 218(19), pp. 3059-3067.
- Semlitsch, R., & Bridges, C. (2005). Amphibian ecotoxicology. In *Amphibian declines: The conservation status of United States species* (pp. 241-243): University of California Press.
- Serrano, N. O., Cabrera, M. F., & Olmedo, P. M. (2001). Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos. I Estrógenos naturales. *Revista de Salud Ambiental*, 1(1), 6-11.
- Severtsova, E. A., Aguillon-Gutierrez, D. R., & Severtsov, A. S. (2012). Frequent anomalies in larvae of common and moor frogs in Moscow area and in the Suburbs of Moscow, Russia. *Russian Journal of Herpetology*, 19(4), 337-348.
- Shinn, C., Marco, A., & Serrano, L. (2008). Inter-and intra-specific variation on sensitivity of larval amphibians to nitrite. *Chemosphere*, 71(3), 507-514.
- Sharp, J. (2010) 'The impacts of urbanization on groundwater systems and recharge', *Aqua Mundi*, 1(3).
- Shook, D., & Keller, R. (2003). Mechanisms, mechanics and function of epithelial–mesenchymal transitions in early development. *Mechanisms of development*, 120(11), 1351-1383.

- Shumway, W. (1940). Stages in the normal development of *Rana pipiens* I. External form. *The Anatomical Record*, 78(2), 139-147.
- Siano, A., Húmpola, M. V. n., de Oliveira, E., Albericio, F., Simonetta, A. C., Lajmanovich, R. and Tonarelli, G. G. (2014) 'Antimicrobial peptides from skin secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae)', *Journal of natural products*, 77(4), pp. 831-841
- Sibley, P. K., Ankley, G. T., Cotter, A. M., & Leonard, E. N. (1996). Predicting chronic toxicity of sediments spiked with zinc: An evaluation of the acid-volatile sulfide model using a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 15(12), 2102-2112.
- Simon, E., Puky, M., Braun, M. and Tóthmérész, B. (2011) 'Frogs and toads as biological indicators in environmental assessment', in Murray, J.L. (ed.) *Frogs: Biology, Ecology and Uses*: Nova Science Publisher.
- Skelly, D. K., & Benard, M. F. (2010). Mystery unsolved: missing limbs in deformed amphibians. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314(3), 179-181.
- Soibelzon, E., Daniele, G., Negrete, J., Carlini, A. and Plischuk, S. (2007) 'Annual diet of the little hairy armadillo, *Chaetophractus vellerosus* (Mammalia, Dasypodidae), in Buenos Aires Province, Argentina', *Journal of Mammalogy*, 88(5), pp. 1319-1324.
- Sotomayor, V., Lascano, C., de D'Angelo, A. M. P., & Venturino, A. (2012). Developmental and polyamine metabolism alterations in *Rhinella arenarum* embryos exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(9), 2052-2058.
- Solé, M. and Pelz, B. (2007) 'Do male tree frogs feed during the breeding season?'
- Sparling, D. W., & Fellers, G. M. (2009). Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(8), 1696-1703.
- Stomach flushing of five syntopic hylid species in Rio Grande do Sul, Brazil', *Journal of Natural History*, 41(41-44), pp. 2757-2763.
- Sparling, D. W. (2000) 'Ecotoxicology of organic contaminants to amphibians', *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, pp. 461-494.
- Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A., & Krest, S. (2010). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*: CRC Press.
- Stebler, E. F., Burks, S. L., Bantle, J. A., & Dawson, D. A. (1988). Evaluation of the developmental toxicity of metal-contaminated sediments using short-term fathead minnow and frog embryo-larval assays. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 7(1), 27-34.
- Staniszewski, M. (1995) *Amphibians in captivity*. TFH.
- Steffen, W., Sanderson, R. A., Tyson, P. D., Jäger, J., Matson, P. A., Moore III, B., Oldfield, F., Richardson, K., Schellnhuber, H.-J. and Turner, B. L. (2006) *Global change and the earth system: a planet under pressure*. Springer Science & Business Media.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., & Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786.

- Stangroom, S., Collins, C., & Lester, J. (1998). Sources of organic micropollutants to lowland rivers. *Environmental Technology*, 19(7), 643-666.
- Stangroom, S., Collins, C., & Lester, J. (2000). Abiotic behaviour of organic micropollutants in soils and the aquatic environment. A review: II. Transformations. *Environmental technology*, 21(8), 865-882.
- Suarez, R. P., Zaccagnini, M. E., Babbitt, K. J., Calamari, N. C., Natale, G. S., Cerezo, A., Codugnello, N., Boca, T., Damonte, M. J., Vera-Candioti, J. and Gavier-Pizarro, G. I. (2016) 'Anuran responses to spatial patterns of agricultural landscapes in Argentina', *Landscape Ecology*, 31(10), pp. 2485-2505.
- Sun, B. Q., Wang, F., Li, H. Z., & You, J. (2015). Occurrence and toxicity of sediment-associated contaminants in guangzhou college city and its adjacent areas: the relationship to urbanization. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(1), 124-131. doi:10.1007/s00244-014-0097-4
- Svartz, G., Herkowitz, & Pérez-Coll. (2012). Sublethal effects of atrazine on embryo-larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology*, 21(4), 1251-1259.
- Svartz, G., Aronzon, C., & Coll, C. P. (2016). Comparative sensitivity among early life stages of the South American toad to cypermethrin-based pesticide. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2906-2913.
- Svartz, G., Meijide, F., & Coll, C. P. (2016). Effects of a fungicide formulation on embryo-larval development, metamorphosis, and gonadogenesis of the South American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 45, 1-7.
- Svartz, G. V., Aronzon, C. M., & Perez Coll, C. S. (2016). Combined endosulfan and cypermethrin-induced toxicity to embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79(5), 197-209
- Svartz, G. V., & Pérez-Coll, C. S. (2013). Comparative toxicity of cypermethrin and a commercial formulation on *Rhinella arenarum* larval development (Anura: Bufonidae). *Int J Environ Health*, 6(4), 320-329.
- Svartz, G. V., Wolkowicz, I. R. H., & Coll, C. S. P. (2014). Toxicity of endosulfan on embryo-larval development of the South American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(4), 875-881.
- Tanzola, R. D. and Villegas-Ojeda, M. A. (2017) 'Argulus ventanensis sp. n.(Crustacea, Branchiura) parasite of *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae)', *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 12(3), pp. 218-226.
- Ternes, T. A. (1998) 'Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers', *Water research*, 32(11), pp. 3245-3260.
- Ternes, T. A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H. and Joss, A. (2004) 'A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge', *Water research*, 38(19), pp. 4075-4084.
- Taylor, W. R., & Van Dyke, G. (1985). Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn (Paris)*, 9(2), 107-119.
- Taylor, A. C., & Kollros, J. J. (1946). Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *The Anatomical Record*, 94(1), 7-23.

- Thibodeaux, L. J., & Bierman, V. J. (2003). Peer reviewed: the bioturbation-driven chemical release process. In: ACS Publications.
- Tietge, J. E., Ankley, G. T., DeFoe, D. L., Holcombe, G. W., & Jensen, K. M. (2000). Effects of water quality on development of *Xenopus laevis*: a frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus* assessment of surface water associated with malformations in native anurans. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(8), 2114-2121.
- Tomar, V., & Pandey, A. (1988). Sublethal toxicity of an insecticide to the epidermal melanophores of *Rana* tadpoles. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 41(4-6), 582-588.
- Trudeau, V. L., Somoza, G. M., Natale, G. S., Pauli, B., Wignall, J., Jackman, P., Doe, K. and Schueler, F. W. (2010) 'Hormonal induction of spawning in 4 species of frogs by coinjection with a gonadotropin-releasing hormone agonist and a dopamine antagonist', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), pp. 36.
- True, C. J., & Heyward, A. A. (1990). Relationships between microtox test results, extraction methods, and physical and chemical compositions of marine sediment samples. *Toxicity Assessment*, 5(1990), 29-45.
- UICN, M. 2008. La Liste rouge des espèces menacées en France-Contexte, enjeux et démarche d'élaboration. MNHN/UICN.
- Unrine, J. M., & Jagoe, C. H. (2004). Dietary mercury exposure and bioaccumulation in southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*) larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(12), 2956-2963.
- USEPA. (1996). *Ecological effects test guidelines: Tadpole/sediment subchronic toxicity test*. Retrieved from
- USEPA. (2000). *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. Retrieved from
- USEPA. (2002). Methods for evaluating wetland condition: using amphibians in bioassessments of wetlands. In: Office of Water, US Environmental Protection Agency Washington.
- U.S. Environmental Protection Agency. Quality Criteria for Water. EPA-440/9-76-023. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 1976
- Valdés, M. E., Marino, D. J., Wunderlin, D. A., Somoza, G. M., Ronco, A. E. and Carriquiriborde, P. (2015) 'Screening concentration of E1, E2 and EE2 in sewage effluents and surface waters of the "Pampas" region and the "Rio de la Plata" estuary (Argentina)', *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 94(1), pp. 29-33.
- Vapñarsky, C. A. (2000) *La aglomeración Gran Buenos Aires: expansión espacial y crecimiento demográfico entre 1869 y 1991*. Eudeba.
- Vera Candioti, J., Natale, G. S., Soloneski, S., Ronco, A. E. and Larramendy, M. L. (2010) 'Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®', *Chemosphere*, 78(3), pp. 249-255.
- Venesky, M. D., Wassersug, R. J., & Parris, M. J. (2010). How does a change in labial tooth row number affect feeding kinematics and foraging performance of a ranid tadpole (*Lithobates sphenoccephalus*)? *The Biological Bulletin*, 218(2), 160-168.
- Vershinin, V. (1989). Morphological anomalies in urban amphibians. *Soviet journal of ecology*, 20(3), 176-182.

- Vershinin, V. L., Vershinina, S. D., Berzin, D. L., Zmeeva, D. V., & Kinev, A. V. (2015). Long-term observation of amphibian populations inhabiting urban and forested areas in Yekaterinburg, Russia. *Scientific data*, 2, 150018.
- Villanova, J. L., P. E. Saibene and M. G. Agostini. 2015. Hypsiboas pulchellus (Montevideo Tree Frog, Ranita de Zarzal). Predation. *Herpetological Review* 46(3):411-412.
- Wang, X., Sun, D. and Yao, T. (2016) 'Climate change and global cycling of persistent organic pollutants: a critical review', *Science China Earth Sciences*, 59(10), pp. 1899-1911.
- Wake, D. B. (1991) 'Declining amphibian populations', *Science*, 253(5022), pp. 860-861.
- Walker, C. H., Sibly, R. and Peakall, D. B. (2016) *Principles of ecotoxicology*. CRC press.
- Warren, N., Allan, I., Carter, J., House, W., & Parker, A. (2003). Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments—a review. *Applied geochemistry*, 18(2), 159-194.
- Weigelt, C., Saare, O. and Schwab, L. (1885) *Die Schädigung von Fischerei und Fischzucht durch Industrie-und Haus-Abwässer: eine experimentelle Studie*. Oldenbourg.
- Welsh Jr, H. H. and Ollivier, L. M. (1998) 'Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's redwoods', *Ecological Applications*, 8(4), pp. 1118-1132.
- Widder, P. D., & Bidwell, J. R. (2008). Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, 88(1), 9-18.
- Wiechmann, A. F., Wirsig-Wiechmann, C. E., & Wirsig-Wiechmann, C. R. (2003). *Color atlas of Xenopus laevis histology* (Vol. 1): Springer Science & Business Media.
- Wijethunga, U., Greenlees, M., & Shine, R. (2015). The acid test: pH tolerance of the eggs and larvae of the invasive cane toad (*Rhinella marina*) in southeastern Australia. *Physiological and Biochemical Zoology*, 88(4), 433-443.
- Wolkowicz, I. R. H., Aronzon, C. M., & Coll, C. S. P. (2013). Lethal and sublethal toxicity of the industrial chemical epichlorohydrin on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae. *Journal of hazardous materials*, 263, 784-791.
- Wilbur, H. M., & Collins, J. P. (1973). Ecological aspects of amphibian metamorphosis: nonnormal distributions of competitive ability reflect selection for facultative metamorphosis. *Science*, 182(4119), 1305-1314.
- Woolrich-Piña, G. A., Smith, G. R., & Lemos-Espinal, J. A. (2015). Effects of salinity and density on tadpoles of two anurans from the Río Salado, Puebla, Mexico. *Journal of Herpetology*, 49(1), 17-22.
- WWF. (2016) Living Planet: Report 2016: Risk and Resilience in a New Era. World wide fund for nature.
- Young, B. E., Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A. and Boucher, T. M. (2004) *Disappearing jewels: the status of new world amphibians*. NatureServe, Arlington.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical analysis/By Jerrold H. Zar* (No. 574.0182 Z3.).

- Zhang, Y., Xie, L., Li, X., Chai, L., Chen, M., Kong, X., ... & Wang, H. (2018). Effects of fluoride on morphology, growth, development, and thyroid hormone of Chinese toad (*Bufo gargarizans*) embryos. *Environmental and molecular mutagenesis*, 59(2), 123-133.
- Ziegler, Virginia, L., Arim, M. and Narins, P. M. (2011) 'Linking amphibian call structure to the environment: the interplay between phenotypic flexibility and individual attributes', *Behavioral Ecology*, 22(3), pp. 520-526.
- Ziegler, L., Berazategui, M., & Arim, M. (2014). Discontinuities and alternative scalings in the density–mass relationship of anuran larvae. *Hydrobiologia*, 723(1), 123-129.
- Zimmerman, B. L. (1994) 'Audio strip transects', *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians*, pp. 92-97.

ANEXO I: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA VINCULADA AL DESARROLLO DE LA TESIS

PRESENTACIONES A CONGRESOS

1- **Sansiñena** J, Arruti E, Alcalde L & Natale GS (2015) Análisis de la frecuencia de anomalías en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a contaminantes de relevancia ambiental..XVI Congreso Argentino de Herpetología. San Miguel de Tucuman, Argentina. (Poster).

2- **Sansiñena**, J.A.; Peluso, L.; Alcalde, L.; Natale, G.S. (2016) Evaluación de la toxicidad de sedimentos provenientes de un agroecosistema utilizando dos especies nativas: *Hyalloa curvispina* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) e *Hypsiboas pulchellus* (AMPHIBIA: ANURA). VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC). (Poster).

3- McCarthy, C.I.; **Sansiñena**, J.A.; Bahl, M.F.; Natale, G.S. (2016) Alternativas para evaluar el riesgo ecotoxicológico de metales pesados empleando anfibios como indicadores. VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC). (Poster).

4- **Sansiñena**, J.A.; Bahl, M.F.; Peluso, L.; Alcalde,L.; Natale, G.S (2016).Evaluación de la toxicidad de sedimentos provenientes de ecosistemas acuáticos con diferente grado de contaminación empleando larvas de *Rhinella arenarum*. XVII Congreso Argentino de Herpetología, II Congreso Paraguayo de Herpetología. (Poster).

5- Piccinini, A.; **Sansiñena**, J.A; Alcalde,L.; Marino, D.M.; Natale,G.S. (2016). Elevada frecuencia de malformaciones en larvas de *Rhinella arenarum* que habitan agroecosistemas. XVII Congreso Argentino de Herpetología, II Congreso Paraguayo de Herpetología. (Poster).

6-**Sansiñena** JA, Alcalde L. & Natale GS (2017) Evaluación de la toxicidad de sedimentos empleando embriones de *Rhinella arenarum*. XVIII Congreso Argentino de Herpetología. (Poster).

7- Barreto, E., **Sansiñena**, JA.; Etchegoyen, MA.; Marino, DJM; Venturino, A.; Natale, GS (2017) Efectos letales y subletales del insecticida lambda-cyhalotrina en larvas de *Hypsiboas pulchellus*. XVIII Congreso Argentino de Herpetología. (Poster).

8-Sansiñena JA, Alcalde L, Peluso L, Natale GS. (2018). Evaluación de la toxicidad de sedimentos afectados por la actividad petroquímica, empleando larvas de *Rhinella arenarum*. IV Jornadas Patagónicas de Biología, III Jornadas Patagónicas de Ciencias Ambientales y VI Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biológicas. 138

9-Sansiñena JA, Cremaschi MA, Oser F ; Peluso L & Natale GS (2018). Evaluación de la toxicidad de sedimentos utilizando dos especies nativas. XIX Congreso Argentino de Herpetología, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

10-Sansiñena J.A, Bahl M.F, Peluso L, Alcalde L, Natale G.S (2018) Evaluación de la sensibilidad de *Rhinella arenarum* en tres etapas de su desarrollo. VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental.

11 -Bahl M.F; Arruti E.; Sansiñena J.A; Brodeur J; Natale G.S (2018). Estado de salud de individuos de *Leptodactylus latrans* (amphiba: anura) que hitan en zonas de descargas cloacales. VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental.

12- Sansiñena JA, Volpe S , Alcalde L; Natale G.S. (2019) Exposición crónica de larvas de *Rhinella arenarum* a sedimentos provenientes de ecosistemas afectados por actividades antrópicas. XX Congreso Argentino de Herpetología, San Juan, Argentina.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

1- Sansiñena, J. A., Peluso, L., Costa, C. S., Demetrio, P. M., Mac Loughlin, T. M., Marino, D. J., & Natale, G. S. (2018). Evaluation of the toxicity of the sediments from an agroecosystem to two native species, *Hyaella curvispina* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) and *Boana pulchella* (AMPHIBIA: ANURA), as potential environmental indicators. *Ecological Indicators*, 93, 100-110.

ANEXO II

Ejemplos de publicaciones obtenidas, con informaciones acerca de: Especie de anuro, estadio, tipo de contaminante, y anomalías y la publicación original de donde fueron obtenidos los datos presentados en la tabla.

PRIMER AUTOR	AÑO	ESPECIES	ESTADIOS	CONTAMINANTES	ANORMALIDADES
Abbasi	1984	<i>Rana Tigina</i>	Embriones	Cromo	Hipo e hiper pigmentación en cabeza, ojos grandes, curvatura y torsión, obstrucción de canal alimenticio.
Agostini	2010	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	25	Cipermetrina	Anormalidades en el eje axial, los ojos, intestino y cabeza.
Aguillon	2015	<i>Hyla plicata</i>	32-46	Plomo y hierro	Curvatura del eje axial, intestino fuera de la cavidad, Anormalidades cutánea, extremidades y pigmentación
Allran	2000	<i>Rana pipiens, rana sylvatica y rhinella arenarum</i>		Atrazina	Ondulación y flexión de la cola, acortamiento axial y edema facial
Aronzon	2011	<i>Rhinella arenarum</i>	Desde 3-4 hasta 25	2,4-D	Edema, microcefalia, agenesia, subdesarrollado de branquias, flexión de cola y cola reducida.
Aronzon	2014	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevo	Diazinón	Flexiones y ondulaciones de la cola, microcefalia, Malformaciones de la boca, estructuras adhesivas, intestinales branquiales, edema, descamación e hidropsia.
Babini	2016	<i>Rhinella arenarum</i>	23 hasta 42	Agua de Agroecosistema	Ausencia de queratodotes, cuerpo diamante, intestino anormal.

PRIMER AUTOR	AÑO	ESPECIES	ESTADIOS	CONTAMINANTE	ANORMALIDADES
Babini	2015	<i>Rhinella arenarum</i>	larvas y metamorfosis	Campos con cultivos y ganado	Anormalidades en la formula dentaria.
Bach	2016	<i>Leptodactylus latrans</i>	25-36	Glifosato	Edemas y falta de queratodontes.
Baskin	1973	<i>Rana catesbeiana.</i>		Taurin	Anormalidad en la pigmentación.
Britson	1998	<i>Hyla chrysoscelis</i>	25-46	Mezcla de Atrazina, Clorpirifos, MSMA, metil mercurio	lordosis, ausencia de ojos, extremidad malformada
Brunelli	2009	<i>Bufo bufo</i>	25	Endosulfan, Azinphosmetil, Mancozeb	Edemas en cabeza, despigmentación, tejido desigual alrededor del hocico, boca anormal, cola asimétrica o doblada, esqueléticas
Brunelli	2010	<i>Bufo Bufo</i>	25-hasta metamorfosis	Endosulfan	Morfología de branquias
Calevro	1998	<i>Triturus vulgaris- Rana esculenta</i>	Eclosión- metamorfosis	Cromo, aluminio, cadmio	Oculares, esqueletales, corazón alargado, proyecciones cardíacas anteriores , ampollas, edemas, cefálicas, hipo pigmentación
Chen	2006	<i>rana pipiens 25-30</i>		Nitrato de plomo	Deformidad espinal (escoliosis)- curvatura espinal lateral
Cooke	1981	<i>rana</i>	Eclosión	Campo de cultivo	Curvatura horizontal y vertical, burbujas en cámara branquial, torcedura lateral, flexión, pliegue
Cooke	1972	<i>Rana temporari, Bufo bufo</i>	Huevo	DDT, Dieldrin y 2,4 D	Anormalidades en Boca, branquias, cola, cambio de pigmentación

PRIMER AUTOR	AÑO	ESPECIES	ESTADIOS	CONTAMINANTE	ANORMALIDADES
Cortes Quintero	1996	<i>Hyla labialis</i>	Embriones	Mercurio, cloro y nitrato	Piel irregular, escoliosis, Branquias atrofiadas, cola irregular, edema, hemorragias, anormalidades en ojos y bocas.
Curi	2017	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	Huevos, 28 y 31	Camas de pollos	Cuerpo diamante, intestino, colas dobladas y disco oral
Dagle	2003	<i>Xenopus laevis</i>	Huevo	Etenuar pixt2	Intestino y corazón anormal
de Lapuente	2014	<i>Xenopus laevis</i>	Huevos	Suelo de rellenos sanitarios	Intestino, cola, notocorda, ojos anormales y edemas
Drake	2007	<i>hylia-buffo- Rana</i>	32-37	Sitios control	Fila de dientes, vaina de la mandíbula, papilas anormales
Goldberg	2015	<i>Hypsiboas riojanus</i>	38	Campo	Gónada segmentada
Goleman	2002	<i>Xenopus laevis</i>	Huevos	Perclorato de sodio	Edemas y colas dobladas
Greulich	2003	<i>Rana aevalis</i>	Huevos y varios estadios	Cipermetrina	Flexión de cola
Gutleb	1999	<i>Xenopus laevis y Rana temporaria</i>	Huevos	PCB	Edemas, cola y ojos anormales
Harris	2000	<i>rana pipien, Bufo americanus</i>		Endosulfan, azinphosmetil, mancozeb	Deformidades esqueléticas, flexión lateral de la cola, ausencia de ojos
Harris, et al	1998	<i>Rana clamitans y Rana pipians</i>	Huevos	Basudin, Diazidon, Diathone, Thiodan	Intestino y branquias anormales, edema, flexión de la cola
Haywood	2004	<i>Xenopus laevis</i>	Huevos	Zinc, cobre, plomo y cadmio	Edemas y cola anormal
Henle	2012	<i>Hyla arborea</i>	36	no se sabe	Cola bifurcada

PRIMER AUTOR	AÑO	ESPECIES	ESTADIOS	CONTAMINANTE	ANORMALIDADES
Hopkins	1999	<i>Rana catesbeiana</i>		Cenizas de residuos de combustión con metales	Anormalidades axiales
Howe	2004	<i>Rana clamitans, R. pipiens, R. sylvatica, and Bufo americanus</i>	20-25	POEA. Roundup Original. Roundup Transorb . Glifos AU	Gónadas y colas anormales
Kadkaru	2018	<i>Lithobates catesbeiana</i>	21-25	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Disco oral, papilas anormales y ausencia de queratodontes
Knapp	2006	<i>Rana muscosa</i>		<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Despigmentación de partes del disco oral
Krishnamurthy	2011	<i>Rana sylvatica</i>	25	Nitrato y Malation	Cola anormal, cuerpos hinchados y cuerpo en diamante
Lajmanovich	2003	<i>Scinax nasicus</i>	25	Glifosato	Edemas, boca, intestino anormal
Lascano	2009	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevo	Metilazinfos y clorpirifos	Descamaciones, atrofas, protuberancias, hidropesia y alteraciones en aleta
Lenkowski	2010	<i>Xenopus laevis</i>	41NF	Atrazine, 2,4-D, triadimefon, and glyphosate	Alteraciones intestinales, edemas, musculatura craneal reducida
Lenkowski	2008	<i>Xenopus laevis</i>	40-47 NF	Atrazina	Hemorragias viscerales, corazón reducido, intestino mal enrollado, columna anormal y edemas
Liendro	2015	<i>Rhinella arenarum</i>	25	Clorpirifos	Edemas, necrosis y flexiones de la cola
Liu	2012	<i>Xenopus tropicalis</i>	Huevos	Tributyltin	Ojos anormales, ausencia de aletas y cuerpos grandes.

PRIMER AUTOR	AÑO	ESPECIES	ESTADIOS	CONTAMINANTE	ANORMALIDADES
Luo	2003	<i>Xenopus laevis</i>	Huevos	Cloruro de zinc y de cobre	Ojos anormales, edema, corazón tubular, intestino, cola anormal, hipo pigmentación
Mathieu-Denoncour	2014	<i>Silurana tropicalis</i>	Huevo	Colorante amarillo	Ojos, eje, cabeza, corazón, intestino anormales, edemas.
Mc Daniel	2004	<i>Rana Pipiens- Rana calamitans</i>	25	Campo	Flexión dorsal y lateral de notocorda, ausencia de ojos, polifalanga, ausencia de dedos, edemas.
Medina	2013	<i>varias</i>	25-46 adulto y juveniles	Museo	Fila de dientes , vaina de la mandíbula, papilas, anormales, cola bifurcada
Moriyama	2010	<i>Xenopus tropicalis</i>	Huevos	Rapamycin	Pigmentación e Intestinos anormales, edemas
Mussi y Calcaterra	2010	<i>Chaunus arenarum</i>		Paraquat	Microcefalia, edemas, colas
Natale	2018	<i>Boana pulchella</i>	25	Aficida	Flexiones, edemas, falta de quertodontes reducción del intestino Axiales y extremidades
Ngangom y Gupta	2013	<i>Fejervarya spp</i>	26-28	Edosulfan	
Osano	2002	<i>Xenopus laevis</i>	Huevos	Amitraz, 2,4 dimetilnilin, paraquat	Ojos, flexiones, intestino, edema
Osano	2001	<i>Xenopus laevis</i>	Huevos	Laclor y metalaclor	Edemas, flexiones y ojos
Park	2017	<i>Bombin orientalis</i>	Huevos	Niquel	Cola, microcefalia, intestino, branquias
Park	2010	<i>Bombina orientalis</i>		Nonilfonol	Despigmentación, colas cortas, ampollas, edemas, cabeza y ojos
Peltzer	2011	<i>S nasicus</i>		Campo agricultura	Cola bifurcada

PRIMER AUTOR	AÑO	ESPECIES	ESTADIOS	CONTAMINANTE	ANORMALIDADES
Peltzer	2013	<i>Trachycephalustyphonius</i>	23-46	Sedimento de agroecosistema	Hinchado, rombo, intestino desenrollado, intestino desviado, colas rígidas, extremidades, viscerales hemorragias
Peltzer	2008	<i>sinax nasicus 37</i>		Campo agricultura	nucleares
Perez-Coll	1988	<i>Rhinella arenarum</i>	Embriones	plomo	Microcefalia, branquias sin desarrollar, cola corta, curva axial, colas bífidas
Plowman	1994	<i>Xenopus laevis</i>	Embriones	Niquel, cobre y cadmio	Despigmentación retiniana, diastematomelia, escoliosis, cifosis, focomelia, deformidades sacro-pélvicas y extremidades posteriores, y displasia del corazón, riñón, ovario e intestino
Quintaneiro	2018	<i>Pelophylax perezi</i>	Embriones	Linuron, S-metolachlor	Edema, curvatura y deformidad, ampollas y macroftalmia
Romansic	2009	<i>Rana cascadae</i>	23-24	Radiaion UV	Flexión, edema y ampollas
Rosenshield	1999	<i>Rana clamitans</i> y <i>Rana pipians</i>	Huevos y 22	PCB,	Edemas, colas flexiones y curvas, cuerpo asimétrico
Rowe	1998	<i>Rana catesbeiana</i>		Cenizas de residuos con metales	Disco oral, papilas ausencia de queratodontes
Ruiz	2010	<i>Rana catesbeiana</i>	Varios	Aguas residuales	Edemas, extremidades, clasificación de la cola y región gular y esclerosis
Ruiz de Arcaute	2012	<i>Rhinella fernandezae</i>	25	Clorpirifos	Flexión de la cola
Sandoval	2011	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevos	2,4 d y esterón ultra	Pigmentación, rugosidades, agnesia, microcefalia, edemas,

tumoraciones, eje ojos y boca anormal.

PRIMER AUTOR	AÑO	ESPECIES	ESTADIOS	CONTAMINANTE	ANORMALIDADES
Sayinm y kaya	2005	<i>Hyla arborea</i>	21-25	Dimetoato	Edemas deformidades de la cola
Severtsova	2012	<i>Rana temporaria and Rana arvalis</i>		Campo (zona urbana y suburbana)	Curvatura espinal, bradigenesis, daño en La piel, edemas branquias, pigmentación, malformación completa
Sotomayor	2012	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevos	Clorpirifos	Curvatura de la cola y descamación, edemas y ampollas
Stebler	1987	<i>Xenopus laevis</i>		Sedimento con Zn como referencia a difentes Ph	Edema en pericárdico aleta ojos, mal enrollamiento de intestino y corazón, retorcimiento de la cola, boca malformada, cabeza, ojos y cerebro pequeño necrosis.
Svartz	2016	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevos	Endosulfan y cipermetrina mezcla	Edemas, colas, microcefalia branquias,
Svartz	2016	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevos - larvas	Fungicida Maxim®XL	Microcefalia, branquias , edemas , cola y pigmentación
Svartz	2012	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevos Y larvas	Atracina	Microcefalia, colas y edema
Svartz	2013	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevos Y larvas	Cipermetrina	Edemas, flexión de la cola, concavidad del cuerpo
Svartz	2014	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevos Y larvas	Endosulfan	Edemas, branquias y flexiones de la cola
Svartz	2016	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevos y larvas	Cipermetrina	Edemas, branquias y colas
Tietge	2000	<i>Xenopus laevis</i>	Huevos	Diferentes tipos de agua con diferentes concentraciones de sales	Craneofaciales y gastrointestinales

PRIMER AUTOR	AÑO	ESPECIES	ESTADIOS	CONTAMINANTE	ANORMALIDADES
Unrine	2004	<i>Rana Sphenocephala</i>	25	Mercurio en dieta	Escoliosis, icroftalia y macromelia
Wolkowicz	2014	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevos	Bisfenol A	Microcefalia, cola, edemas, ampollas, branquias y aparato bucal
Wolkowicz	2013	<i>Rhinella arenarum</i>	Huevos	Epichlorohydrin	Orales, flexiones, edemas
Zhang	2018	<i>Bufo gargarizans</i>	Huevos	Fluoruro	Edemas, lordosis, hiperplasia, descamación

ANEXO III: PROTOCOLO DE BIOENSAYO

La evaluación de la toxicidad de sedimentos para los anfibios cuenta con una guía ASTM E2591-07 donde se describe un estudio de exposición a sedimentos en 10 días (ASTM, 2007). La especie elegida para esta prueba fue *Lithobates pipiens*, aunque el protocolo especifica que se pueden usar otros anuros norteamericanos, como *Anaxyrus americanus*. Una ventaja de este protocolo es que emplea métodos similares a otras pruebas de toxicidad de sedimentos con invertebrados (USEPA, 2000) y, si se combina con estas otras pruebas, puede proporcionar un panorama más completo de los posibles impactos de los sedimentos contaminados en los organismos acuáticos.

Este método para la realización de bioensayos permite obtener información acerca de la toxicidad de sedimentos, empleando como modelo de estudio larvas de anuros. La especie utilizada para la realización de estos test es *B. pulchella*. Si bien las condiciones especificadas son para muestras de sedimento completo, estos test también podrían ser realizados con muestras de agua.

1-Organismos

Adultos: El presente protocolo propone la utilización de larvas de anuros autóctonos siendo el modelo utilizado para la realización de los bioensayos *Boana pulchella*. Además de esta especie, el protocolo fue utilizado con éxito para evaluar la toxicidad de sedimentos empleando larvas de *Rhinella arananum*. Por lo tanto es posible la utilización de otros anuros realizando las adaptaciones pertinentes para cada especie.

Los adultos pueden ser obtenidos en campañas realizando su búsqueda en los hábitats adecuados, considerando los recaudos de obtener previamente los permisos de flora y fauna requeridos para la captura de anuros. La especie *B. pulchella* es un rana arborícola de tamaño mediano que presenta una longitud total de 37 a 50 mm. Habita en una gran variedad de ambientes en toda la provincia de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Misiones, Neuquén, Río Negro y Santa Fe. Además de Argentina, se ha reportado en los países de Brasil, Paraguay y Uruguay. Se la suele encontrar en pastizales inundables, alrededor de charcas temporarias o permanentes pequeños arroyos y lagunas. En cuanto a su periodo de actividad, es la especie que presenta mayor amplitud en cuanto a su actividad. Solo esta inactiva durante el invierno, momento en el cual hiberna. La mayor parte del año se encuentra realizando algún tipo de actividad como ser el desplazamiento, la reproducción o alimentación. Por lo tanto la captura de adultos de esta especie puede realizarse durante gran parte del año a diferencia de otras especies de anuros resultado ser una ventaja para su utilización en bioensayos. Para obtener información detallada de la especie puede consultar Gallardo, 1974; Cei 1980; Natale, 2006).

El mantenimiento de los adultos puede ser llevado a cabo en un terrario el cual puede ser confeccionado siguiendo las recomendaciones para individuos de la familia Hyliidae (Nace, 1977; Mattison, 1987; Staniszewski, 1995; ASoIaH, 2004). Se los alimentará una vez por semana con larvas de *Tenebrio molitor*, y variedades de dípteros adultos e isópodos (Da Rosa et al., 2011; Antoniazzi et al., 2013). Para evaluar la condición de bienestar en cautiverio, se realizarán prospecciones generales de los individuos cada 30 días y se tomarán medidas de los individuos (Longitud total y peso) para conocer su estado de condición. Los procedimientos de cría y mantenimiento de anuros en cautiverio deberán ser evaluados debidamente por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

Huevos: Las puestas pueden ser obtenidas a partir de los procedimientos propuestos por Natale (2006), como ser, la colecta de amplexos en campo en el cual las parejas en amplexo detectadas en el campo son colocadas en frascos de vidrio con agua de la charca y un soporte vegetal y se dejan en el campo hasta el otro día cuando se procede a retirar la puestas y dejar los adultos en el campo o la recolección directa de las puestas en la cual, se colectan puestas recién colocadas en el ambiente. Una vez detectadas e identificadas se procede, realizando la menor perturbación posible, a introducir una parte de la puesta (10%) junto con el agua circundante y el soporte vegetal, dentro de una bolsa de polietileno para su posterior traslado al laboratorio.

En laboratorio las puestas se colocan en bateas plásticas de 45 L donde son mantenidas hasta su eclosión en las siguientes condiciones controladas de laboratorio: Periodo de luz:oscuridad (16:8), con agua de bioensayo (agua de red previamente filtrada por filtro físico Aqua-Pure® de 5 µ Modelo AP-110 H/C y aireada por 48 h enérgicamente con el objetivo de eliminar el cloro); temperatura aire-agua, 25 ± 1 °C; pH = $7,6 \pm 0,1$; oxígeno disuelto, 7,7; 0.3 mg/l; conductividad, 1025 ± 15 µS/cm; dureza, 181 ± 35 mg/l CaCO₃; burbujeo en bateas, constante 90 burbujas/min).

La calidad y fertilidad de los huevos será inspeccionada, considerándose aceptable una tasa de fertilidad mayor del 80% y más de un 75% de sobrevivencia de embriones normales al alcanzar el estadio de neurula. A fin de caracterizar los estadios embrionarios de *B. pulchella* se utilizará la tabla de Gosner (1960).

Larvas: Una vez que los embriones hallan eclosionado, los individuos muertos serán registrados y retirados, los restantes individuos serán colocados en bateas de plástico respetando la densidad de 10 individuos por litro de agua y mantenidos en las condiciones de laboratorio previamente mencionadas. Las larvas a partir del día 25 serán alimentadas con lechuga procesada, en tal caso, el alimento deberá provenir de huertas que no utilicen agroquímicos o 1 g de escamas para peces (TetraMin®, Tetra Werke, Alemania o Shulet®Carassius, Shulet S.A, Argentina), cuatro veces por semana.

Para la selección de los organismos para las pruebas de toxicidad se deberá tener en cuenta la morfología normal correspondiente a cada estadio (Gosner 1960). Es recomendable hacer una selección a fin de descartar los individuos demorados en el desarrollo, deformes o dañados. La manipulación puede hacerse con una pipeta de plástico utilizando para la

selección capsulas de Petri de vidrio.

2-Sedimento

Colecta de sedimento: En cada sitio de estudio se toma un total de 3L de sedimento realizando la menor perturbación posible del ambiente. Se tomaran múltiples (submuestras) dentro del sitio de estudio, para que la muestra represente mejor las condiciones ambientales. Cada una de las muestras compuestas se deberá tomar a una profundidad entre 10 y 30 cm según el cuerpo de agua, recogiendo los primeros 15 cm del horizonte del sedimento, que generalmente representan la zona más bioactiva y el área de exposición más probable. Se seleccionara para la primera submuestra un punto de fácil acceso y de posible sedimentación y las sucesivas submuestras se toman cada 2 metros aproximadamente hasta completar los 3L necesarios.

Para la colecta de sedimento se pueden emplear varias herramientas según la dificultad de acceso. El empleo de la draga resulta útil cuando se dispone de cierta altura, como ser un puente para arrojar la misma. La pala de jardinería resulta ser apropiada para recolectar los sedimentos en los sitios poco profundos y de fácil accesibilidad. En aquellos sitios que presentan acceso difícil o mucha profundidad y al extraer el sedimento con pala este se perdía, el tubo corel resulta ser la herramienta más adecuada. Cada submuestra se colecta en una bandeja, se mezcla (homogeneizó con el resto) y se realiza una primera limpieza retirando las piezas grandes de material vegetal y otros desechos, tales como rocas y vidrio. Las muestras deben ser guardadas en bolsas de polipropileno para su traslado al laboratorio y cerradas con precintos.

En el laboratorio las muestras deben ser mantenidas hasta su utilización en bolsas negras (oscuridad) y 4 ° C.

Caracterización de los sedimentos: Es recomendable realizar, a las muestras de sedimentos, análisis de determinados parámetros como ser pH, carbono orgánico total, tamaño de partícula, Otras caracterizaciones serán necesarias dependiendo del objetivo del estudio. Estas pueden incluir análisis químicos de compuestos orgánicos o inorgánicos.

3 -Diseño experimental

Para el diseño experimental de los bioensayos de toxicidad con sedimento se siguieron las siguientes condiciones del protocolo ASTM (2007).

El tipo de iluminación empleada debe ser de alto espectro con tubos fluorescentes de 36 W con una iluminación de 100 a 1000 lux. El fotoperiodo empleado de 16:8 Luz/ oscuridad correspondiente con las horas luz- oscuridad que se da en verano. Los recipientes empleados deben ser de vidrio de 1500 cm³ de capacidad y tapa de polipropileno. El régimen de alimentación de las rvas es de 8 mg de alimento para peces en escamas (TetraMin®, Tetra Werke, Alemania o Shulet®Carassius, Shulet S.A, Argentina) por día, por recipiente. Realizando una reducción de la cantidad suministrada proporcionalmente con la mortalidad. Se deben emplear 6 réplicas por tratamiento y los ensayos tienen una duración de 10 días. Como controles negativos se utilizó agua de ensayo sin sedimento. Las variables de respuesta evaluada son mortalidad, crecimiento, desarrollo, comportamiento y

anormalidades.

La Calidad del agua debe ser medida cada 48 Hs. Midiéndose, oxígeno disuelto, conductividad, pH y temperatura, empleando multiparamétrico model WA-2017SD. Además, se debe determinar la alcalinidad, la cual puede realizarse por titulación ácido base de acuerdo al método 2320 (APHA, 1998), expresando los resultados en $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ y la dureza por titulación con EDTA, de acuerdo al método 2340C (APHA, 1998), expresando los resultados en $\text{mgCaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$.

Para el diseño experimental de los bioensayos de toxicidad con sedimento se modificaron las siguientes condiciones del protocolo ASTM (2007), para ser utilizado con *B. pulchella*

La **temperatura** de ensayo, el protocolo establecía una temperatura de 23 °c. Se prefiere una temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 16:8 h de luz y oscuridad, respectivamente, con la intención de simular las condiciones de verano que ocurren en el área de estudio. Además, se encontraron fundamentos en este sentido en diversos trabajos citados en libros de índole tanto biológica (Feder, 1992; Duellman y Trueb, 1994; McDiarmid y Altig, 1999) como ecotoxicológica (Rand, 1995; Sparling et al., 2000, Linder et al., 2003).

Los ensayos se realizaron con **agua de red**. El uso de este tipo de agua ha sido adoptado internacionalmente como una opción para la realización de pruebas de toxicidad en laboratorio (APHA, 1998). En consecuencia, el pH y la dureza dependen de ligeras variaciones asociadas a su provisión. Independientemente de ello, se realizan mediciones de parámetros de calidad del agua de red y de muestras de campo de los sitios de estudio para su comparación. Al agua de red utilizada en las pruebas se le realiza un procedimiento de circulación enérgica de aire (para eliminar el cloro) y filtrado por filtro físico Aqua-Pure® de 5 micrones (Modelo AP-110 H/C), antes de su reposado y aireación. La selección del método es la propuesta por Natale (2006).

Numero de organismos por recipiente: El protocolo establece utilizar 5 larvas por replica. Considerando que el número inicial de individuos por cámara de prueba se vincula con la necesidad de garantizar un número adecuado de individuos para cumplir con los requisitos de las pruebas estadísticas sumado a la baja prevalencia de anormalidades. Se aconseja utilizar 10 larvas por replica. Por otro lado al evaluar la toxicidad sobre embriones resulta conveniente utilizar el doble de organismos (n=20) considerando la elevada tasa de mortalidad en esta etapa.

Volúmenes de agua y sedimento empleados: El protocolo establece utilizar 175 ml de agua y 100 ml de sedimento, para evaluar la toxicidad empleando 5 larvas por recipiente. Considerando, como se indicó en el ítem anterior, que el número de organismos por

recipiente se duplico (N 10) resulta conveniente aumentar al doble los volumen empleados de agua y sedimento para respetar las proporciones utilizadas y la densidad de 1gr de larvas por L de agua establecidas para su buen desarrollo.

La elección de los **estadios de desarrollo** y consecuentemente la edad a la cual son expuestos los renacuajos, se fundamenta desde el punto de vista biológico, en los acontecimientos ocurridos durante el desarrollo del ciclo larval, considerando los cambios morfológicos sufridos durante el desarrollo (desde huevo hasta la metamorfosis) clasificados por Gosner (1960) y los objetivos del bioensayo. Se considera en una primera instancia emplear larvas en estadio 25 de Gosner, al ser la etapa más temprana de la forma larval con movilidad y alimentación propia, que según los principios de la toxicología acuática, es la etapa más sensible (Burkhart, 2003). A esto se le suma la importancia de la homogeneidad respecto al tiempo en que todos los huevos y embriones se desarrollan simultáneamente hasta alcanzar el estadio 25. Por otro lado los embriones resultan ser más apropiados para evaluar efectos en el desarrollo y por último las larvas en estadio 30 próximos a la metamorfosis son consideradas una etapa sensible ya que presnetan el climax metamórfico.

La **renovación del medio** se realiza cada 48 Hs (tipo semi estático) considerado que el bioensayo fue diseñado para incluir tanto la exposición de contaminantes a sedimentos como a la columna de agua se prioriza mantener la tasa de renovación para evitar la excesiva dilución del agua que podrían llevar a una subestimación de toxicidad del sedimento, además se consideró que la falta de recambio no modifique significativamente los parámetros físico-químicos establecidos en las recomendaciones del protocolo ASTM 2007.

El recambio puede ser llevado a cabo extrayendo cada 48h, 200 ml del agua sobrenadante empleando una manguera de acuario y una propipeta para succionar el agua procurando minimizar la perturbación de los sedimentos.

Las condiciones experimentales establecidas se resumen a continuación:

Parámetro	Condición: <i>Rana pipiens</i>	<i>B. pulchella- R. arenarum</i>
Tipo de ensayo	Ensayo de toxicidad con sedimento completo con renovación del agua supradistante.	Ensayo de toxicidad con dilución de sedimento con renovación del agua supradistante.
Temperatura	23 +/- 1°C	25 +/- 1°C
Calidad lumínica	Alto espectro de luz fluorescente	Tubo fluorescente 36 W
Iluminación	Desde 100 a 1000 lux	Desde 100 a 1000 lux
Fotoperiodo	16 L:8N	16 L:8N
Recipientes de ensayo	Recipientes de plástico o vidrio de 400 o 500 ml o cámara con sistema de drenaje	Recipientes de vidrio de 1500cm ³ de capacidad
Volumen de sedimento	100ml	200 ml
Volumen de agua supradistante	175 ml	350 ml
Renovación de agua supradistante	Mediante flujo continuo o estático con recambio diario	Con recambio parcial cada 48 Hs
Edad de los organismos	Menor o igual a 72 hs, 24 o menos	Estadio 25 Gosner
Numero de organismos por recipiente	5	10 20 *
Numero de replicas	Dependen de los objetivos del test. 8 réplicas son recomendadas para ensayo de rutina.	6
Alimentación	4 mg de tetramin por recipiente diariamente después de que alcancen el ST 25, reducir proporcionalmente con la mortalidad	4 mg de tetramin por recipiente diariamente después de que alcancen el ST 25, reducir proporcionalmente con la mortalidad
Aireación	Sin aireación, a menos que el oxígeno del agua supradistante caiga por debajo de 3 mg/L	Sin aireación
Agua supradistante	Agua del sitio, agua con la misma dureza y alcalinidad que la del sitio, lago natural o agua superficial, agua de laboratorio	Agua de red filtrada y declorinada

Calidad del agua	Dureza, alcalinidad, conductividad, pH, oxígeno disuelto, y amoníaco al comienzo y al final del ensayo, Temperatura y oxígeno disuelto, diariamente. Amoníaco se puede medir (día 1,3,7)	Dureza, alcalinidad, conductividad, pH, oxígeno disuelto al comienzo y al final del ensayo, Temperatura y oxígeno disuelto, diariamente.
Duración del ensayo	10 días	10 días
Puntos finales	Supervivencia y desarrollo	Mortalidad, crecimiento, desarrollo, comportamiento, anormalidades
carga	Relación entre más (gr de renacuajo/ml de agua (175ml)	AGREGAR 1gr/L
Aceptabilidad del ensayo	Supervivencia mínima media del control 80%, longitud media del control entre 4 y 7 mm.	Supervivencia mínima media del control 80%

4 –Procedimiento

Inicio de prueba (Día -1). Se preparan las cámaras de prueba para la realización del bioensayo. Para ello a cada da frasco de vidrio de 1500 ml de capacidad se le agrega 200ml de sedimento, el cual debe estar completamente homogeneizado, posteriormente se agrega el agua supra adyacente (350 ml) a cada frasco de tal manera de minimizar la perturbación del sedimento. Esto se puede lograr fácilmente vertiendo el agua lentamente contra el vidrio del frasco. Las cámaras de prueba así preparadas se dejan imperturbables durante 24 horas para lograr el equilibrio entre las fases.

Día de adición de organismos (Día 0): Se realizan mediciones de parámetros fisicoquímicos en las cámaras de prueba como ser: oxígeno disuelto, temperatura, pH y conductividad realizando la menor perturbación posible, posteriormente se adicionan las larvas utilizando una pipeta con diámetro lo suficientemente grande como para prevenir la constricción y el daño de los animales. La etapa de desarrollo (etapa de Gosner), la longitud y el peso de los renacuajos deben ser documentado mediante el examen de un subconjunto de al menos 10 organismos tomados como parámetros.

Día de lectura, recambio y mediciones (Día 1): Se realiza la primera lectura del ensayo, determinando para cada cámara de prueba los individuos vivos. Si se observan individuos muertos estos se deberán extraer de las cámaras de prueba. Se observa y evalúa la natación de los organismos y la presencia de anormalidades notorias a simple vista. Posteriormente se procede a realizar el recambio de agua supra adyacente. Se retira una cantidad de 200 ml de agua suprayacente de cada tratamiento para realizar todas las caracterizaciones y análisis

químicos necesarios. La extracción del agua debe hacerse con la menor perturbación posible. Esto se logró utilizando una manguera de 4-6mm y una propipeta para succionar el agua de las cámaras la cual fue recogida en un vaso de precipitado a continuación se agregan 200 ml de agua de ensayo a cada replica para reestablecer los volúmenes de agua. Por último se realizan las mediciones de los parámetros fisicoquímicas del agua extraída (Dureza, alcalinidad, oxígeno disuelto, temperatura, pH y conductividad).

Día (Día 2 al 9): Durante los siguientes días se realiza la lectura diaria del bioensayo, las mediciones de oxígeno, temperatura, conductividad y pH y 48 Hs el recambio de agua como se indicó anteriormente. En el caso que el oxígeno estuviera por debajo de 3 mg/l se procede a realizar recambio de agua cada 24 Hs. Las larvas deben ser alimentadas diariamente con 4 mg de Tetramin por recipiente, esta cantidad debe reducirse proporcionalmente con la mortalidad de los individuos.

Finalización de la prueba (Día 10): Se realiza la última lectura del ensayo y se procede a fijar las larvas para futuras mediciones. Todos los organismos vivos de cada cámara de prueba deben colocarse en un vaso pequeño y deben ser anestesiados y fijados antes de que se realicen mediciones de longitud, peso, estadio de desarrollo y presencia de anormalidades. Se realizan además las mediciones finales de caracterización del agua supraadyacente (Dureza, alcalinidad, oxígeno disuelto, temperatura, pH y conductividad).

ANEXO IV: TABLAS CORRESPONDIENTES AL CAPÍTULO 4

Parámetros fisicoquímicos del agua supra adyacente de los Bioensayos

Tabla 1. Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en el Bioensayo con larvas en Estadio 25 de *B. pulchella* correspondientes a los tiempos inicial (Día 1) y final (Día 10) de ensayo para las distintas muestras de los sitios de estudio.

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxígeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 1							
Referencia	3	88	100	6,6	0,625	6,1	22,22
	4	132	165	6,2	0,939	7,49	22,4
	5	76	85	6,6	0,988	7,53	21,7
Agrícola	6	72	80	5,3	0,94	7,5	21
	7	124	95	5,5	1,015	7,2	22,2
	8	160	130	5,1	1,069	7,79	22,3
Día 10							
Referencia	3	100	105	5,8	0,623	6,25	22
	4	184	167	5,9	0,942	7,55	21
	5	152	410	5,1	0,978	7,8	20,8
Agrícola	6	132	400	5,4	0,926	7,66	21
	7	128	720	5,4	1,002	8,27	21,6
	8	183	585	5	1,049	7,9	21,4

Tabla 2. Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en el Bioensayo con larvas en Estadio 25 de *B. pulchella* correspondientes a los tiempos inicial (Día 1) y final (Día 10) de ensayo para las distintas muestras de los sitios de estudio.

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxígeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 1							
	1	160	95	3,1	1,088	6,9	21,3
Referencia	3	172	250	3,2	0,982	7,29	21,3
	4	124	100	2,8	1,004	7,63	22
	5	252	125	2,9	1,003	6,77	21,5
Agrícola	6	148	175	2,6	1,028	7,29	22
	7	140	115	2,5	1,011	7,35	21,6
	8	180	150	2,5	1,022	7,24	21,5
	9	84	75	2,3	0,897	7,28	21,5
	10	160	150	2,7	1,037	6,91	21,8
Urbana	11	124	85	3,8	1,001	7,15	21,5
	12	140	135	3	1,058	7,21	21,5
	13	140,8	115	1,7	1,051	7,28	21,3
	14	172	115	1,5	1,026	7,22	21,3
	15	184	150	1,8	1,118	7,04	21,3
Industrial	16	184	165	2	1,095	7,16	22
	17	132	100	1,2	1,027	7,28	21,6
	18	180	115	2,8	1,133	7,31	21,3
Cloacas	20	164	145	2,3	1,083	7,22	21,4

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxígeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 10							
Referencia	1	168	145	3,1	1,385	6,58	21
	3	180	260	3	1,035	7,21	21
Agrícola	4	128	95	2,8	0,958	7,3	21,4
	5	256	140	2,4	0,945	7,45	21
	6	152	120	3,2	0,972	6,25	20,7
	7	148	135	3,8	0,965	6,38	20,9
	8	196	160	3,4	0,978	6,61	21,1
	9	100	90	3	0,947	7,52	20,6
Urbana	10	164	160	3,7	1,023	7,76	21,2
	11	140	105	3,2	1,055	7,55	20,9
	12	152	160	3	1,032	7,32	20,7
	13	144	145	2,8	0,957	7,39	20,6
Industrial	14	180	155	3,2	1,021	7,26	21,1
	15	192	125	2,4	0,894	7,56	21,7
	16	196	180	2,8	0,984	7,59	20,8
	17	136	110	2,1	0,936	7,22	20,9
	18	196	125	3,4	1,214	7,19	21,2
Cloacas	20	188	165	3,5	1,066	7,52	20,6

Tabla 3. Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en el Bioensayo con larvas en Estadio 25 de *B. pulchella* correspondientes a los tiempos inicial (Día 1) y final (Día 10) de ensayo para las distintas muestras de los sitios de estudio.

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxígeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 1							
Referencia	3	162	450	3,5	0,96	7,11	21,1
	4	126	142	3,2	0,947	7,6	21,3
Agrícola	5	254	136	2,5	1,128	7,32	22,1
	6	157	165	3,3	0,881	7,36	22,5
	7	147	125	3	0,955	7,16	21,7
	8	192	143	3,4	0,92	7,24	22,6
	9	98	84	3,5	0,857	7,13	22,2
	10	154	152	3,6	0,93	6,86	22,2
Urbana	11	132	87	4,2	1,559	9,99	22,5
	12	136	139	3,3	1,069	7,45	23,2
	13	148	114	2,2	1,095	7,21	23,5
Industrial	14	170	112	2,7	1,952	7,39	23,5
	15	181	147	2,6	1,22	7,51	22,3
	16	183	163	2,5	1,048	7,62	21,1
	17	129	98	2,6	1,73	7,43	21,5
	18	176	113	2,7	1,021	7,37	21,5
	19	148	120	3,7	0,95	7,41	21,8
	20	154	144	2,2	1,014	7,48	22,7

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxígeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 10							
Referencia	3	165	452	3,4	0,959	7,15	21,5
	4	130	143	3,3	1,443	7,60	21,2
Agrícola	5	255	136	2,5	0,949	7,34	22
	6	158	165	3,3	1,130	7,39	22,3
	7	150	126	2,9	0,875	7,20	21,9
	8	193	144	3,4	0,957	7,25	22,6
	9	100	86	3,7	0,920	7,15	22,2
	10	153	154	3,5	0,857	6,89	22,2
Urbana	11	140	88	4,2	0,929	6,94	22,5
	12	148	142	3,3	1,059	7,47	23,2
	13	154	120	2,5	1,078	7,17	24,1
Industrial	14	–	–	–	–	–	–
	15	183	154	2,7	1,924	7,53	22,3
	16	185	166	2,3	1,219	7,63	21,2
	17	130	99	2,6	1,044	7,49	21,5
	18	180	114	2,7	1,071	7,40	21,5
	19	150	125	2,8	1,023	7,48	21,8
Cloacas	20	158	145	2,3	0,956	7,55	21,7

Tabla 4. Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en el Bioensayo con larvas en Estadio 25 de *R. arenarum* correspondientes a los tiempos inicial (Día 1) y final (Día 10) de ensayo para las distintas muestras de los sitios de estudio.

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxígeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 1							
Referencia	1	136	115	4,8	1,071	7,11	21,5
	3	120	65	4,5	0,78	7,51	22
Agrícola	4	248	80	4,5	0,807	7,48	22,2
	5	160	60	4,5	0,811	7,51	22,2
	6	116	95	5	0,746	7,52	21,9
	7	148	130	3,5	0,809	7,4	21,8
	8	180	95	3,4	0,965	7,34	21,7
	9	136	60	2,8	0,928	7,24	21,5
Urbana	10	112	70	3,3	0,892	7,47	20,9
	11	164	115	3,9	0,859	7,27	21,7
Industrial	14	128	65	4,4	0,854	7,48	21,6
	16	212	75	2,1	11,92	7,51	21,6
Cloacas	20	96	95	4,2	0,647	6,63	21,8

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxigeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 10							
Referencia	1	140	45	5,0	0,907	7,2	24
	3	136	75	4,7	0,820	7,6	25
Agrícola	4	184	110	4,9	0,750	7,47	24
	5	152	70	4,3	0,790	7,49	24
	6	100	120	4,9	0,980	7,3	24
	7	168	160	3,5	0,914	7,47	24
	8	136	115	2,6	0,913	7,73	25
	9	200	130	2,4	0,860	7,48	24
	Urbana	10	156	80	5,0	0,914	7,76
11		232	175	3,6	0,710	7,42	24
Industrial	14	–	–	–	–	–	–
	16	236	160	1,8	0,916	7,14	24
Cloacas	20	184	75	4,3	0,781	7,14	24

Tabla 5. Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en el Bioensayo con larvas en Estadio 8 de *B. pulchella* correspondientes a los tiempos inicial (Día 1) y final (Día 10) de ensayo para las distintas muestras de los sitios de estudio.

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxigeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 1							
Referencia	1	160	95	3,2	1,225	6,74	22,0
	3	172	250	4,6	1,010	7,24	22,0
Agrícola	4	124	100	3,1	0,957	7,00	22,0
	5	252	125	2,9	0,961	7,30	22,0
	6	148	175	3,0	0,972	6,10	22,0
	7	140	115	3,5	0,923	6,30	22,0
	8	180	150	3,0	0,918	6,80	22,0
	9	84	75	3,3	0,955	7,10	22,0
	Urbana	10	160	150	3,6	1,055	7,40
11		124	85	3,9	1,042	7,32	22,0
12		140	135	3,3	1,033	7,44	22,0
13		140,8	115	3,1	0,915	7,56	22,0
Industrial	14	172	115	2,4	1,095	6,92	22,3
	15	185	150	2,5	0,925	7,22	22,1
	16	184	165	2,6	0,936	7,33	22,0
	17	132	100	2,5	0,915	7,09	22,0
	18	180	115	3,9	1,125	7,15	22,0
Cloacas	20	154	145	3,2	1,036	7,22	22,0

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxígeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 10							
Referencia	1	168	145	3,2	1,325	6,45	23,0
	3	180	260	3,1	1,020	7,23	22,0
Agrícola	4	128	95	3,0	0,989	7,15	22,1
	7	148	135	3,1	0,936	6,32	22,4
	8	152	120	2,4	0,974	6,23	22,0
	9	100	90	3,1	0,962	7,48	22,5
Urbana	11	140	105	3,2	1,056	7,52	22,1
	12	152	160	3,0	1,025	7,20	22,0
	13	144	145	2,9	0,954	7,36	2,40
Industrial	17	136	110	2,2	0,925	7,15	22,2
	18	196	125	3,1	1,214	7,13	22,2

Tabla 6. Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en el Bioensayo con larvas en Estadio 8 de *R.arenarum* correspondientes a los tiempos inicial (Día 1) y final (Día 10) de ensayo para las distintas muestras de los sitios de estudio.

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxígeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 1							
Referencia	3	216	260	2,5	1,052	7,14	22,1
Agrícola	4	176	80	3,0	1,098	7,45	22,3
	5	128	120	3,0	1,139	7,45	22,5
	7	200	95	3,4	1,112	7,48	23,1
	8	140	350	2,6	0,987	7,05	22,6
Urbana	11	164	80	3,8	1,090	7,48	23,5
	12	208	175	2,7	1,850	7,39	22,0
	13	168	130	2,5	1,208	7,41	22,1
Industrial	14	132	155	1,9	1,350	7,68	22,5
	15	172	172	2,9	1,230	7,33	22,8
	16	216	216	2,9	1,227	7,51	22,4

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)	Oxígeno (mg/L)	Conduct (ms)	pH	T (°C)
Día 10							
Referencia	3	196	310	2,5	1,259	7,21	22,2
Agrícola	4	200	55	3,2	1,254	7,58	22,5
	5	296	190	3,3	1,156	7,43	22,4
	7	272	155	3,5	1,148	7,45	23,1
	8	260	100	2,8	0,987	7,12	22,8
Urbana	11	188	80	3,9	1,084	7,39	23,6
	12	208	185	2,4	1,820	7,42	22,4
	13	168	145	2,3	1,358	7,38	22,0
Industrial	14	–	–	–	–	–	–
	15	192	145	3,1	1,254	7,34	22,9
	16	228	170	3,2	1,224	7,46	22,8

Tabla 7. Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en los Bioensayo con larvas en Estadio 8, 25 y 30 de *B. pulchella* correspondientes a los tiempos inicial (Día 1) y final (Día 10) de ensayo para las distintas muestras de los sitios de estudio.

Estadio 8

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)		Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)		Oxigeno (mg/L)		Conduct (ms)		pH		T (°C)	
		Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10
	1	142	147	125	136	3,7	3,9	0,627	0,638	7,01	7,55	25	24,9
	3	133	136	41	54	4,4	4,4	0,561	0,526	6,34	7,27	25,5	25,4
Agrícola	4	254	259	121	128	6,9	3	0,731	0,728	7,4	7,65	25,4	25,4
	5	247		197		3,6		0,782		7		25,4	
	6	184	186	70	78	3,8	4	0,72	0,729	7,72	7,63	25,2	25,3
	7	192	196	119	125	3,4	3,3	0,711	0,698	7,02	7,38	25,4	25,4
	8	100	102	107	116	7,2	2,9	0,815	0,807	7,06	7,73	25,4	25,4
	9	162	165	179	189	3,2	7,2	0,719	0,725	7,19	7,78	26,5	25,5
Urbana	11	147	150	196	197	3,5	3,7	0,761	0,752	6,98	7,29	25,2	23,6
	12	140	141	119	126	2,9	3,4	0,714	0,712	7,07	7,43	25,7	25,8
	13	159	162	171	174	3,4	3,1	0,667	0,669	6,88	7,48	25,6	26,5
Industrial	14	188		127		2,5		0,696		7,37		25,6	
	15	195	196	170	174	3,3	3,2	0,833	0,824	7,28	7,71	25,3	25,7
	16	184	187	191	197	2,9	2,4	0,813	0,754	7,55	7,77	25,3	25,5
	17	136	140	160	169	4,4	3,3	0,926	0,972	7,44	7,26	25,5	25,3
	18	195	198	133	132	2,5	3,1	1,38	1,41	7,38	7,43	26,2	25,9
	19	187	175	185	178	3,2	3	0,497	0,833	7,34	7,45	26,2	25,6
Cloacas	20	165	176	120	119	2,5	2,9	0,836	0,61	7,67	7,43	25,9	26,5
	21	125		125		1,5		1,012		7,87		25,7	

Estadio 25

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)		Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)		Oxigeno (mg/L)		Conduct (ms)		pH		T (°C)	
		Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10
	1	148	149	100	102	4,3	5,5	0,669	0,700	7,04	6,72	24	24,6
	3	100	112	95	96	2,5	3,1	5,583	0,587	6,60	6,71	24,8	24,6
Agrícola	4	160	156	195	197	2,7	3,9	0,685	0,756	7,34	6,65	24,8	24,6
	5	140	142	158	162	3,3	4,9	0,712	0,729	7,35	6,55	24,9	24,6
	6	148	151	124	145	2,5	3,1	0,754	0,751	7,34	6,81	24,9	24,6
	7	140	139	144	146	2,8	3,4	0,775	0,773	7,31	6,75	25	24,6
	8	200	196	243	247	2,8	3,7	0,770	0,769	7,29	6,51	24,8	24,8
	9	172	165	136	147	2,3	2,7	0,710	0,722	7,8	6,60	25,1	25,1
Urbana	11	144	136	189	188	3,6	3,5	0,644	0,676	7,32	6,68	24,7	25,3
	12	164	152	159	163	3,9	4,6	0,147	0,778	4,47	6,61	25,3	25,5
	13	244	196	113	125	3,2	3,7	1,055	0,902	7,51	6,71	25,3	25,5
Industrial	14	140		125		2,5		0,950		7,56		26	
	15	120		116		2,7		0,831		7,33		24,5	
	16	128	143	112	110	3,0	3,5	0,967	0,951	6,56	9,59	25	24,9
	17	168	145	216	214	3,0	1,4	1,055	0,863	7,48	6,52	25,3	24,9
	18	156	158	215	247	2,1	2,3	0,817	0,659	7,56	6,20	25,2	25,7
	19	184	186	178	125	2,1	2,5	0,728	1,094	7,63	6,52	25,6	25,7
Cloacas	20	124	129	253	247	2,9	3,1	0,960	0,866	6,92	6,57	25,4	25,7
	21	208	214	168	172	3,7	3,5	0,708	0,873	7,08	6,40	25,6	25,7

Estadio 30

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)		Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)		Oxigeno (mg/L)		Conduct (ms)		pH		T (°C)	
		Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10
Referencia	1	210	198	253	248	2,8	5,3	0,743	0,758	7,40	7,23	24,6	24
	3	172	175	146	149	2,3	3,5	0,648	0,658	6,84	6,82	24,8	24
Agrícola	4	154	126	199	18	3,6	2,9	0,768	0,478	7,14	7,12	24,9	23,8
	5	164	152	159	163	3,9	4,3	0,751	0,742	7,45	7,50	24,8	23,6
	6	244	196	113	125	3,2	3,8	0,813	0,921	7,56	7,53	24,7	24,1
	7	140	147	125	135	2,5	2,5	0,797	0,776	7,68	7,62	24,8	24,2
	8	120	125	116	120	2,7	3,6	0,819	0,821	6,94	6,84	25,4	23
	9	160	156	195	197	3,5	3,7	0,848	0,886	7,24	7,03	25,2	24,4
Urbana	11	140	142	158	162	2,7	2,8	0,837	0,869	7,43	7,23	25,3	24,7
	12	148	151	124	145	3,6	3,4	0,709	0,759	7	7,12	25	24,3
	13	140	139	144	146	4,2	4,3	0,679	0,637	7	7,08	25,1	24
Industrial	14	200	196	243	247	3,5	3,7	0,755	0,733	7,30	7,21	25,2	23,9
	15	172	165	136	147	3,6	3,6	0,946	0,952	7,60	7,54	25	23,8
	16	148	149	100	102	2,7	2,8	0,854	0,851	7,56	7,59	25,3	24,3
	17	100	112	95	96	4,5	4,0	1,126	1,135	7,18	7,45	25,1	24
	18	160	156	195	197	2,7	2,8	0,948	0,962	7,43	7,41	25,4	24,1
	19	140	142	158	162	3,5	3,1	1,014	1,016	7,57	7,14	25,4	23,5
Cloacas	20	148	149	100	120	2,6	2,4	0,814	0,825	7,65	7,21	25	24
	21	100	112	95	100	2,5	2,9	1,010	1,020	7,39	7,41	25,1	24,1

Tabla 8. Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en los Bioensayo con larvas en Estadio 8, 25 y 30 de *R. arenarum* correspondientes a los tiempos inicial (Día 1) y final (Día 10) de ensayo para las distintas muestras de los sitios de estudio.

Estadio 8

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)		Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)		Oxigeno (mg/L)		Conduct. (ms)		pH		T (°C)	
		Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10
Referencia	3	212	175	110	125	2,1	2,9	0,825	0,884	6,87	7,06	22,1	23,2
Agrícola	4	208	126	150	160	3,9	2	0,185	1,116	6,7	7,08	22,2	22,9
	5	192	152	80	90	2,7	2,8	0,758	0,849	6,67	7,11	22,8	22,4
	6	184	196	80	95	2,1	1,6	0,747	0,828	6,29	6,94	23,4	23,3
	7	192	147	90	125	2,5	2,3	0,781	0,844	7,02	7,04	22,7	22,5
	8	260	125	95	105	2,1	4,5	0,721	0,913	6,29	7,5	22,7	22,8
	9		156	100			3,6		0,872		6,67		23
Urbana	10	216	196	110	109	3,2	3,3	0,765	0,942	6,32	7,44	22,7	23,1
	11	192	142	110	110	2,9	1,4	1,024	1,155	6,87	7,19	23,9	22,9
	12	276	151	155	175	2,6	2,3	1,154	1,093	7,02	7,31	23,1	22,3
	13	192	139	95	130	3,2	2,4	0,927	0,949	7,05	7,07	23,2	22,5
Industrial	14	128		230		4		1,352		7,25		22,4	
	15	180	165	100	115	4,2	2,6	1,023	1,036	6,99	7,33	22,3	22,8
	16	164	149	85	95	3,8	2,1	0,702	0,806	6,89	6,87	22,5	22,1
	17	208	112	95	110	4,2	3	0,824	0,965	6,9	7,39	23,3	22,1
	18	284	156	95	115	4	2,6	0,708	0,858	6,86	7,22	23,1	22,8
	19	128	142	75	90	2,9	2,8	0,671	0,785	6,53	7,07	23	24,9

Estadio 25

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)		Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)		Oxígeno (mg/L)		Conduct (ms)		pH		T (°C)	
		Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10
Referencia	3	256	175	120	125	2,4	2,9	0,931	0,887	7,07	7,06		23,2
Agrícola	4	260	165	145	160	2,5	2	0,874	1,125	7,71	7,41	22	22,1
	5	189	149	102	99	2,5	2,8	1,241	0,847	7,49	7,21	22,3	22,5
	6	185	112	106	108	2,1	2,5	1,023	0,236	7,41	6,58	22,2	22,4
	7	148	147	145	125	2,7	2,1	0,781	0,854	6,93	6,89	22	22,1
	8	254	125	178	105	2,5	1,6	0,938	0,7865	7,49	7,52	21,9	22
	9	145	156	100	147	3,5	2,3	0,835	0,866	7,31	7,31	22,4	22,3
Urbana	10	214	126	120	109	3,2	3,3	1,065	0,974	7,92	7,23	22,5	22,8
	11	184	152	154	110	3,4	2,4	1,077	1,124	7,59	6,99	22,6	22,4
	12	247	196	165	165	2,5	2,5	1,242	1,032	7,73	7,21	22	22,5
	13	125	139	100	139	2,5	3,1	1,171	0,927	7,27	7,09	22,1	22,5
Industrial	14	147		156		2,5		1,081		7,2		22,1	
	15	184	185	120	147	2,5	3,2	1,108	1,047	7,2	7,45	22,4	22,1
	16	169	174	165	124	3,4	2,5	1,055	0,809	7,52	6,25	22,1	22,6
	17	206	208	152	133	3,5	3,9	0,947	0,963	7,13	7,26	22,5	22,7
	18	226	230	123	116	6	2,8	0,932	0,865	7,76	7,33	22	22
	19	136	142	100	98	3,5	2,7	0,972	0,945	7,36	7,1	22	22,8

Estadio 30

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)		Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)		Oxígeno (mg/L)		Conduct (ms)		pH		T (°C)	
		Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10
Referencia	3	138	144	95	93	2,4	2,7	1,055	0,809	7,41	7,21	22,1	22,8
Agrícola	4	249	198	160	160	2,5	3,2	0,947	0,963	6,93	7,09	22,1	22,6
	5	127	141	95	134	3,2	3,9	1,065	0,865	7,49	7,45	22,1	22,7
	6	149	152	151	145	3,4	2,8	1,077	0,945	7,2	6,25	22,5	22
	7	186	187	115	142	2,5	2,5	1,242	1,047	7,52	6,89	22	22,8
	8	171	176	160	119	2,5	2,8	1,241	0,7865	7,13	7,52	22,4	22,4
	9	208	210	147	128	2,5	2,5	1,023	0,866	7,76	7,31	22	22,5
Urbana	10	256	127	173	100	2,1	3,1	0,781	0,974	7,36	7,23	21,9	22
	11	147	158	95	142	2,7	2,9	0,938	1,124	7,31	7,06	22	22,3
	12	216	128	115	104	2,5	2	0,835	1,032	7,92	7,41	22	22,1
	13	186	154	149	105	3,4	2,1	0,931	0,927	7,59	7,26	22,4	22,1
Industrial	14	258	177	115	120	3,5	3,4	0,874	0,887	7,73	7,33	22,5	22,5
	15	262	167	140	155	6	3,6	0,932	1,125	7,27	7,1	22,6	23,2
	16	191	151	97	94	3,5	2,3	0,972	0,847	7,2	7,21	22	22,1
	17	187	114	101	103	2,5	3,3	1,171	0,236	7,07	6,58	22,3	22,5
	18	150	149	140	120	2,5	2,4	1,081	0,854	7,71	6,99	22,2	22,4
	19	126	142	124	100	3,5	2,5	1,108	0,987	7,49	6,78	22,1	22,5
Cloacas	21	132		116		2,5		1,154		7,52		22,3	

Tabla 9. Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante del Bioensayo Crónico con larvas de *R. arenarum* correspondientes a los tiempos inicial (Día 1) y final (Día 102) de ensayo para las distintas muestras de los sitios de estudio.

Problemática	Sitios	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)		Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)		Oxígeno (mg/L)		Conduct (ms)		pH		T (°C)	
		Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10
Referencia	1	268	275	125	124	3,6	4,1	0,838	0,856	7,7	7,24	22,5	
	3	224	231	120	121	2,5	4,7	0,909	1,013	7,52	7,64	22,5	24,4
Agrícola	5	120	122	95	100	2,5	3	0,682	0,938	7,62	7,06	22,5	24,4
	9	152	153	85	90	4,5	2,5	0,836	1,002	7,15	7,36	22,4	24,3
Urbana	11	184	182	173	100	2,6	3,6	0,732	0,928	6,97	7,01	22,3	24,2
	12	196	190	95	90	2	2,3	0,726	1,549	7,53	7,13	22,3	24,1
Industrial	15	180	181	140	154	2,3	3,1	0,759	1,193	7,42	7,14	22,3	24,3
	16	204	200	97	95	4,1	2,5	0,902	1,119	7,19	7,17	22,3	24,3
	18	244	236	100	120	3,5	2,3	0,856	0,927	6,9	7,26	22,3	24,2
Cloacas	20	112	114	250	231	2,6	2,5	0,776	0,539	7,6	7,3	22,3	24
	21	121	127	100	115	5,4	2,7	0,846	0,872	7,13	7,25	22,3	24,2

Tabla 10. Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante de los Bioensayo con diluciones de sedimento con larvas de *R. arenarum* correspondientes a los tiempos inicial (Día 1) y final (Día 10) de ensayo para las distintas muestras de los sitios de estudio.

Descargas Cloacales

Dilución	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)		Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)		Oxígeno (mg/L)		Conduct (ms)		pH		T (°C)	
	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10
100	172	181	180	186	2,5	2,4	1,346	1,165	6,61	6,76	23,2	24,2
75	168	174	110	125	2,5	2,3	1,33	0,973	6,63	6,77	23,4	24,2
50	176	165	70	89	2,7	2,5	1,161	1,077	6,37	6,74	23,4	24,2
25	152	144	95	106	3,2	3,1	0,968	1,177	6,31	7,33	23,7	24,3
12,5	144	136	80	97	2,6	3	0,868	1,104	6,03	7,53	23	24,6
6,5	124	127	80	99	2,8	2,5	0,818	0,969	6,12	6,67	24,4	24,7
0	76	87	60	87	3,7	3,6	0,777	1,025	7,41	6,82	25,2	24,9

Industrial

Dilución	Dureza (mg CaCO ₃ .L-1)		Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L-1)		Oxígeno (mg/L)		Conduct. (ms)		pH		T (°C)	
	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10	Día 1	Día 10
100	165	176	170	6,4	3	2,4	0,65	0,916	7,37	7,7	23	23
75	146	175	105	7,7	3,4	2,3	0,668	0,913	7,31	7,69	23	23
50	165	168	75	5,7	3,5	2,5	0,549	0,897	7,06	7,79	24	23
25	162	168	105	4,2	4,6	3,1	0,657	0,876	6,91	7,65	24	23
12,5	147	198	110	3,1	3,8	3	0,625	0,897	6,83	7,68	23	23
6,5	139	136	90	3,9	3,5	2,5	0,628	0,854	6,8	7,59	24	23
0	100	87	75	3,7	3,8	3,6	0,653	0,771	6,53	7,45	24	23

Tablas resumen de las pruebas de significancia para los bioensayos realizados:

Estadio 25

Boana pulchella

Tabla 11- Tabla resumen Anova de mortalidad para ensayos con *B. pulchella* en estadio 25 y la prueba a posteriori Dunnett.*

		SC	Gl	CM	F	p
Ensayo 1	Intersección	50,68	1,00	50,68	51939,37	0,00
	sitio	0,01	5,00	0,00	1,14	0,36
	Error	0,03	29,00	0,00		
Ensayo 2	Intersección	70,18	1,00	70,18	1993,41	0,00
	sitio	18,55	18,00	1,03	29,26	0,00
	Error	3,34	95,00	0,04		
Ensayo 3	Intersección	207,62	1,00	207,62	2956,99	0,00
	sitio	9,25	18,00	0,51	7,32	0,00
	Error	6,67	95,00	0,07		

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Ensayo 2		Ensayo 3	
Sitios	p	Sitios	p
1		3	
3	1,00	4	0,78
4	0,00	5	0,99
5	0,63	6	0,99
6	0,04	7	0,92
7	0,99	8	0,99
8	1,00	9	1,00
9	0,00	10	1,00
10	0,99	11	0,73
11	0,00	12	1,00
12	0,00	13	1,00
13	0,00	14	0,00
14	0,00	15	0,00
15	0,00	16	0,99
16	0,00	17	1,00
17	0,00	18	0,99
18	0,00	19	0,99
20	1,00	21	0,07

Tabla 12- Tabla resumen Anova de crecimiento para ensayos con *B. pulchella* en estadio 25 y la prueba a posteriori Dunnett.*

		SC	Gl	CM	F	p
Ensayo 1	Intersección	33,44	1,00	33,40	28152,77	0,00
	sitio	0,01	5,00	0,00	2,18	0,05
	Error	0,03	29,00	0,00		
Ensayo 2	Intersección	1039,34	1,00	1039,34	9173,38	0,00
	sitio	7,84	16,00	0,49	4,32	0,00
	Error	9,40	83,00	0,11		
Ensayo 3	Intersección	1652,93	1,00	1652,93	13761,66	0,00
	sitio	64,19	17,00	3,77	31,44	0,00
	Error	10,57	88,00	0,12		

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
Sitios	p	Sitios	p	Sitios	p
3		1		0	
4	0,90	3	0,98	3	1,00
5	0,03	4	0,77	4	0,00
6	0,77	5	0,98	5	0,01
7	0,26	6	1,00	6	0,00
8	0,42	7	1,00	7	0,13
		8	0,41	8	0,68
		9	1,00	9	0,00
		10	1,00	10	0,00
		11	0,92	11	0,00
		12	0,97	12	0,00
		13	0,58	13	0,00
		16	1,00	15	0,00
		17	0,12	16	0,28
		18	0,87	17	0,00
		20	0,00	18	0,00
		22	0,99	19	0,00
				21	0,00

Tabla 13- Prueba de significancia Kruskals- Wallis variable desarrollo para ensayos con *B. pulchella* en estadio 25 y la prueba a posteriori de comparación múltiple*

	Kruskal-Wallis test: H (5, N= 35) =12,97550 p =,0236	Ensayo 1 Múltiple comparación	
		sitios	sitio 3
Ensayo1	Kruskal-Wallis test: H (5, N= 35) =12,97550 p =,0236	0	
Ensayo2	Kruskal-Wallis test: H (15, N= 95) =0,000000 p =1,000	1	1,00
Ensayo3	Kruskal-Wallis test: H (17, N= 106) =0,000000 p =1,000	2	1,00
		3	0,41
		4	1,00
		5	0,89

Tabla 14 Prueba de significancia Anova de anomalías para ensayos con *B. pulchella* en estadio 25 y la prueba a posteriori Dunnett.*

Ensayo 1		sitio	Id p	Hp p	Aq p	Ch p
Intestino desplazado: Id	F(5, 29)=,96114, p=,45755					
Hipopigmentación: Hp	F(5, 29)=10,081, p=,00001	1	1,00	0,84	0,94	1,00
Ausencia de Queratodotes: AQ	F(5, 29)=8,4892, p=,00005	2	0,97	0,84	0,11	1,00
Cuerpo Hinchado: Ch	F(5, 29)=4,3770, p=,00433	3	1,00	0,39	1,00	1,00
		4	0,38	0,00	1,00	1,00
		5	0,20	0,22	0,00	0,00

Ensayo 2		Ensayo 2		Ensayo 3		
	F(16, 83)=,96114, p=,45755	Sitios	Aq p	Sitios	Hp	Id
					p	p
Intestino desplazado: Id	F(16, 83)=1,4321, p=,14718	10	1,00	3		
Flexión de la cola: Fx	F(16, 83)=1,1167, p=,35386	11	0,86	4	1,00	1,00
Ausencia de querat.: Aq	F(16, 83)=3,3941, p=,00013	12	0,48	5	1,00	1,00
Edema: E	F(16, 83)=,91571, p=,55438	13	0,86	6	1,00	1,00
Hipopigmentación: Hp	F(16, 83)=1,6171, p=,08221	16	0,00	7	1,00	1,00
		17	0,01	8	1,00	1,00
		18	0,85	9	1,00	1,00
		20	1,00	10	0,00	0,14
		22	0,99	11	1,00	1,00
				12	1,00	1,00
				13	1,00	1,00
				14	1,00	1,00
				15	1,00	1,00
				16	1,00	0,00
				17	1,00	1,00
				18	1,00	1,00
				19	1,00	1,00
				21	1,00	0,99

Rhinella arenarum

Tabla 15- Tabla resumen Anova de mortalidad para ensayos con *R. arenarum* en estadio 25 y la prueba a posteriori Dunnett.*

	SC	Gl	CM	F	p	Sitios	p
Intersección	148,58	1,00	148,58	4136,82	0,00	1	0,98
sitio	13,78	12,00	1,15	31,98	0,00	3	
Error	2,33	65,00	0,04			4	0,98
						5	0,98
						6	0,98
						7	0,88
						8	0,98
						9	0,98
						10	0,56
						11	0,00
						14	0,00
						16	0,79
						20	0,98

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 16- Tabla resumen Anova de crecimiento para ensayos con *R. arenarum* en estadio 25 y la prueba a posteriori Dunnett.*

	SC	Gl	CM	F	p	Sitios	p
Intersección	148,58	1,00	148,58	4136,82	0,00	1	0,06
sitio	13,78	12,00	1,15	31,98	0,00	2	
Error	2,33	65,00	0,04			4	0,66
						5	0,03
						6	0,01
						7	0,01
						8	0,25
						9	0,07
						10	0,22
						11	0,00
						16	0,03
						20	0,05

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 17- Prueba de significancia Kruskals- Wallis variable desarrollo para ensayos con *R. arenarum* en estadio 25 y la prueba a posteriori de comparación múltiple*

Kruskal-Wallis test: $H(11, N= 72) = 47,40960$ $p = ,0000$

Sitios	1	2
1		1,00
2	1,00	
4	1,00	1,00
5	1,00	1,00
6	1,00	0,02
7	1,00	1,00
8	1,00	1,00
9	0,06	0,60
10	0,15	0,01
11	1,00	1,00
16	1,00	1,00
20	0,04	0,54

Tabla 18. Prueba de significancia Anova de anomalías para ensayos con *R. arenarum* en estadio 25 y la prueba a posteriori Dunnett.*

		Cc	Id	Fq	Fpc
		p	p	p	p
Cuerpo cóncavo: Cc	$F(11, 60) = 2,2696, p = ,02167$				
Intestino desplazado: Id	$F(11, 60) = 5,8657, p = ,00000$				
Ausencia querat. Aq	$F(11, 60) = 2,8972, p = ,00403$				
Ausencia de Pico corneo: Apc	$F(11, 60) = 2,2746, p = ,02139$				
		1,00	1,00	1,00	1,00
		1,00	1,00	1,00	1,00
		1,00	0,99	1,00	1,00
		1,00	0,50	0,47	1,00
		1,00	0,99	0,94	1,00
		1,00	1,00	0,83	1,00
		1,00	1,00	1,00	1,00
		1,00	0,00	1,00	1,00
		0,00	0,00	0,00	0,00
		1,00	0,13	0,83	1,00
		1,00	1,00	1,00	1,00

Ensayo estadio 8

B. pulchella

Tabla 19- Tabla resumen Anova de mortalidad para ensayos con *B. pulchella* en estadio 8 y la prueba a posteriori Dunnett.*

	SC	Gl	CM	F	p	Sitios	p
Intersección	41,84	1,00	41,84	557,54	0,00	1	0,29
sitio	32,17	17,00	1,89	25,22	0,00	3	
Error	6,75	90,00	0,08			4	0,80
						5	0,00
						6	0,00
						7	1,00
						9	1,00
						10	0,00
						11	0,39
						12	1,00
						13	1,00
						14	0,00
						15	0,00
						16	0,00
						17	0,76
						18	1,00
						20	0,00

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 20- Tabla resumen Anova de crecimiento para ensayos con *B. pulchella* en estadio 8 y la prueba a posteriori Dunnett.*

	SC	Gl	CM	F	p	Sitios	p
Intersección	592,90	1,00	592,90	14671,91	0,00	1	0,55
sitio	1,97	9,00	0,22	5,43	0,00	3	
Error	1,94	48,00	0,04			4	1,00
						7	0,11
						9	0,01
						11	0,04
						12	0,25
						13	0,94
						17	0,05
						18	0,04

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 21- Prueba de significancia Kruskals- Wallis variable desarrollo para ensayos con *B. pulchella* en estadio 8 y la prueba a posteriori de comparación múltiple.

Kruskal-Wallis test: $H(9, N= 58) = 0,000000$ $p = 1,000$

Sitios	N	Suma de Ranks	Media de Rank
1	6	306,00	51,00
3	6	306,00	51,00
4	6	306,00	51,00
5	6	306,00	51,00
6	6	306,00	51,00
7	6	306,00	51,00
9	6	306,00	51,00
10	6	306,00	51,00
11	5	255,00	51,00
12	6	306,00	51,00
13	6	306,00	51,00
14	6	306,00	51,00
15	6	306,00	51,00
16	6	306,00	51,00
17	6	306,00	51,00
18	6	306,00	51,00
20	6	306,00	51,00

Tabla 22. Prueba de significancia Anova de anomalías para ensayos con *B. pulchella* en estadio 8 y la prueba a posteriori Dunnett..

	F(9, 48)=,62614, p=,76892	Id
	F(9, 48)=2,3832, p=,02553	Sitios p
Flexión de la cola : Fx		1 1,00
Intestino desplazado: Id		3
Edema: E	F(9, 48)=,94491, p=,49612	4 0,98
Ausencia de quert.: Aq	F(9, 48)=1,7566, p=,10190	7 1,00
Cuerpo asimétrico: Ca	F(9, 48)=,95632, p=,48701	9 0,03
Anormalidades en ojos	F(9, 48)=,84860, p=,57607	11 0,96
		12 1,00
		13 1,00
		17 0,07
		18 0,30

R. arenarum

Tabla 23- Tabla resumen Anova de mortalidad para ensayos con *R. arenarum* en estadio 8 y la prueba a posteriori Dunnett.*

	SC	Gl	CM	F	p	Sitios	p
Intersección	86,27	1,00	86,27	1106,25	0,00	3	
sitio	11,12	10,00	1,11	14,26	0,00	4	0,97
Error	4,21	54,00	0,08			5	1,00
						6	0,38
						8	0,84
						11	1,00
						12	1,00
						13	1,00
						14	0,00
						15	0,97
						16	0,00

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 24- Tabla resumen Anova de crecimiento para ensayos con *R. arenarum* en estadio 8 y la prueba a posteriori Dunnett.*

	SC	Gl	CM	F	p	Sitios	p
Intersección	1399	1	1399	87208	0	3	
sitio	5	9	1	35	0	4	0,00
Error	1	48	0			5	0,00
						6	0,00
						8	0,00
						11	0,00
						12	0,00
						13	0,00
						15	0,00
						16	0,00

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 25- Prueba de significancia Kruskals- Wallis variable desarrollo para ensayos con *R. arenarum* en estadio 8 y la prueba a posteriori de comparación múltiple.

Kruskal-Wallis test: H (9, N= 58) =49,28 p <,005

Sitios	N	Suma de Ranks	Media de Rank	p
3	6	330,0	55,00	
4	6	156,00	26,00	0,01
5	6	185,00	30,83	0,04
6	6	156,00	26,00	0,01
8	6	156,00	26,00	0,01
11	6	156,00	26,00	0,01
12	6	156,0	26,00	0,01
13	6	156,000	26,00	0,01
15	6	156,00	26,00	0,01
16	4	104,00	26,00	0,01

Tabla 26. Prueba de significancia Anova de anomalías para ensayos con *R. arenarum* en estadio 8 y la prueba a posteriori Dunnett.

Flexión de la cola: Fx F(9, 48)=4,4621, p=,00028
 Edema: E F(9, 48)=3,0252, p=,00608
 Intestino desplazado: Id F(9, 48)=23,179, p=,00000
 Ausencia de Querat: Aq F(9, 48)=4,5897, p=,00021

Sitios	Fx p	E p	Id p	Aq p
3				
4	0,92	1,00	0,01	0,93
5	0,00	1,00	1,00	1,00
6	0,01	1,00	0,91	1,00
8	0,00	0,98	1,00	1,00
11	0,03	0,04	0,00	0,63
12	0,95	1,00	1,00	1,00
13	0,13	1,00	0,97	1,00
15	0,72	0,02	0,15	0,00
16	1,00	0,42	0,91	1,00

Bioensayos en tres estadios de desarrollo 8-25-30.

Tabla 27- Tabla resumen Anova de mortalidad para ensayos con *B. pulchella* en estadios 8-25-30 y la prueba a posteriori Dunnett.*

	SC	Gl	CM	F	p	Sitios	Estadio 8 p	Estadio 25 p	Estadio 30 p	
Estadio 8	Intersección	39,46	1,00	39,46	674,04	0,00				
	sitio	18,14	18,00	1,01	17,21	0,00	1	1,00	0,96	0,72
	Error	5,56	95,00	0,06			3			
Estadio 25	Intersección	88,20	1,00	88,20	1280,51	0,00	4	0,06	0,94	0,89
	sitio	12,82	18,00	0,71	10,34	0,00	5	0,00	0,93	0,93
	Error	6,54	95,00	0,07			6	0,78	0,81	1,00
Estadio 30	Intersección	65,88	1,00	65,88	1595,75	0,00	7	0,94	0,84	0,45
	sitio	7,28	18,00	0,40	9,79	0,00	8	0,79	0,94	1,00
	Error	3,92	95,00	0,04			9	0,17	0,99	0,64
						11	1,00	0,00	0,23	
						12	0,02	0,07	0,17	
						13	0,98	0,00	0,96	
						14	0,00	0,00	0,00	
						15	0,02	0,00	0,00	
						16	0,58	0,59	0,02	
						17	1,00	0,52	0,00	
						18	0,00	0,00	0,00	
						19	0,96	0,69	0,00	
						20	0,72	0,01	0,97	
						21	0,00	0,31	0,96	

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 28- Tabla resumen Anova de crecimiento para ensayos con *B. pulchella* en estadios 8-25-30 y la prueba a posteriori Dunnett.*

Estadio		SC	Gl	CM	F	p	Estadio 8		Estadio 25		Estadio 30	
							Sitios	p	Sitios	p	Sitios	p
Estadio 8	Intersección	0,00	1,00	0,00	150,49	0,00						
	sitio	0,00	14,00	0,00	2,00	0,03	1	0,64	1,00	0,99	1	1,00
	Error	0,00	59,00	0,00			3		3,00		3	
Estadio 25	Intersección	1195,01	1,00	1195,01	5610,72	0,00	6	0,96	4,00	0,98	4	0,33
	sitio	12,34	17,00	0,73	3,41	0,00	7	0,47	5,00	0,98	5	1,00
	Error	18,10	85,00	0,21			8	1,00	6,00	0,97	6	0,79
Estadio 30	Intersección	1,10	1,00	1,10	986,31	0,00	9	0,78	7,00	0,88	7	0,90
	sitio	0,12	16,00	0,01	6,82	0,00	11	0,61	8,00	0,69	8	0,96
	Error	0,09	77,00	0,00			12	0,84	9,00	0,94	9	1,00
							13	0,62	11,00	0,62	11	0,09
							15	0,52	12,00	0,85	12	0,95
							16	0,96	13,00	0,11	13	0,96
							17	0,68	15,00	1,00	16	0,01
							18	0,43	16,00	0,78	17	0,32
							19	0,92	17,00	1,00	18	0,02
							20	0,97	18,00	1,00	19	0,10
									19,00	0,98	20	0,10
									20,00	0,86	21	1,00
									21,00	0,44		

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 29- Prueba de significancia Kruskals- Wallis variable desarrollo para ensayos con *B. pulchella* en estadio 8-25-30 y la prueba a posteriori de comparación múltiple*

Estadio 8- Kruskal-Wallis test: $H(15, N=85) = 3,462$ $p=1,000$

Estadio 25- Kruskal-Wallis test: $H(17, N=103) = 3,526$ $p=1,000$

Estadio 30- Kruskal-Wallis test: $H(17, N=106) = 3,474$ $p=1,000$

Tabla 30. Prueba de significancia Anova de anomalías para ensayos con *B. pulchella* en estadio 8-25-30 y la prueba a posteriori Dunnett.*

Estadio 8	Intestino desplazado: Id	$F(15, 69)=235,66, p=0,0000$
	Flexión de la cola: Fx	$F(15, 69)=13,311, p=,00000$
	Ausencia de Quer. : Aq	$F(15, 69)=235,66, p=0,0000$
Estadio 25	Ausencia de Quer. : Aq	$F(17, 85)=2,5661, p=,00234$
	Hipopigmentación: Hp	$F(17, 85)=9,3317, p=,00000$
	Intestino desplazado: Id	$F(17, 85)=,77291, p=,71832$
Estadio 30	Ausencia de Quer. : Aq	$F(17, 88)=20,911, p=0,0000$
	Edema: E	$F(17, 88)=,97669, p=,49105$
	Intestino desplazado: Id	$F(17, 88)=,97669, p=,49105$

Sitios	Estadio 8			Estadio 25			Estadio 30	
	Id	Fx	Aq	Sitios	Aq	Hp	Sitios	Aq
1	1,00	1,00	1,00	1	0,95	1,00	1	1,00
3				3			3	
4	1,00	1,00	1,00	4	0,08	1,00	4	1,00
6	1,00	1,00	1,00	5	0,11	0,00	5	1,00
7	1,00	1,00	1,00	6	0,55	1,00	6	1,00
8	1,00	1,00	1,00	7	0,89	1,00	7	1,00
9	1,00	1,00	1,00	9	0,88	1,00	8	1,00
11	0,00	1,00	0,00	11	0,95	1,00	9	1,00
12	1,00	1,00	1,00	12	0,77	1,00	11	1,00
13	1,00	1,00	1,00	13	0,95	1,00	12	1,00
15	0,00	1,00	0,00	15	0,00	1,00	13	1,00
16	0,00	0,00	0,00	16	0,21	1,00	15	0,00
17	1,00	1,00	1,00	17	0,95	1,00	16	0,00
18	0,00	1,00	0,00	18	0,95	1,00	17	0,00
19	1,00	1,00	1,00	19	0,13	1,00	18	1,00
20	1,00	1,00	1,00	20	0,95	1,00	19	1,00
				21	0,95	1,00	20	1,00
							21	1,00

Tabla 31- Tabla resumen Anova de mortalidad para ensayos con *R. arenarum* en estadio 8-25-30 y la prueba a posteriori Dunnett.*

		SC	Gl	CM	F	p	Estadio 8	Estadio 25	Estadio 30	
		Intersección	sitio	Error	Sitios	p				p
Estadio 8	Intersección	79,95	1,00	79,95	1055,19	0,00				
	sitio	20,15	16,00	1,26	16,62	0,00				
	Error	6,44	85,00	0,08			3			
Estadio 25	Intersección	90,99	1,00	90,99	1596,98	0,00	4	0,05	0,97	0,63
	sitio	18,67	16,00	1,17	20,48	0,00	5	0,00	1,00	1,00
	Error	4,79	84,00	0,06			6	0,92	1,00	0,78
Estadio 30	Intersección	143,73	1,00	143,73	4590,21	0,00	7	0,00	0,99	0,99
	sitio	25,36	17,00	1,49	47,63	0,00	8	1,00	0,05	0,93
	Error	2,82	90,00	0,03			9	0,00	0,01	1,00
							10	1,00	0,05	1,00
							11	1,00	0,00	0,00
							12	1,00	0,05	0,36
							13	1,00	0,00	0,99
							14	0,00	0,00	0,00
							15	0,96	0,00	0,00
							16	0,99	0,00	0,00
							17	0,00	0,00	0,00
							18	0,00	0,00	0,00
							19	0,08	0,00	0,50
							21			0,00

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 32- Tabla resumen Anova de crecimiento para ensayos con *R. arenarum* en estadio 8-25-30 y la prueba a posteriori Dunnett.*

		SC	Gl	CM	F	p	Estadio 8	Estadio 25	Estadio 30		
		Intersec.	sitio	Error	Sitios	p	Sitios	p	Sitios	p	
Estadio 8	Intersec.	2823,82	1,00	2823,82	4440,32	0,00					
	sitio	76,38	14,00	5,46	8,58	0,00					
	Error	45,79	72,00	0,64			3				
Estadio 25	Intersec.	2877,09	1,00	2877,09	14802,39	0,00	4	0,75	4,00	0,98	
	sitio	7,74	14,00	0,55	2,84	0,00	5	0,00	5,00	1,00	
	Error	13,99	72,00	0,19			6	0,00	6,00	0,17	
Estadio 30	Intersec.	4396,56	1,00	4396,56	23382,01	0,00	7	1,00	7,00	0,97	
	sitio	29,79	15,00	1,99	10,56	0,00	8	1,00	8,00	0,64	
	Error	15,04	80,00	0,19			8	1,00	8,00	0,64	
							10	0,69	9,00	1,00	
							11	0,88	10,00	0,98	
							12	0,01	11,00	1,00	
							13	1,00	12,00	1,00	
							15	0,00	13,00	0,70	
							16	0,76	16,00	0,86	
							17	0,86	17,00	0,13	
							18	0,99	18,00	0,62	
							19	1,00	19,00	0,96	
										19	0,02

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 33- Prueba de significancia Kruskals- Wallis variable desarrollo para ensayos con *R. arenarum* en estadio 8-25-30 y la prueba a posteriori de comparación múltiple*

Estadio 8-Kruskal-Wallis test: H (14, N= 87) =65,34 p =,**0001**

Estadio 25- Kruskal-Wallis test: H (15, N= 88) =30,50 p =,06

Estadio 30- -Kruskal-Wallis test: H (15, N= 96) =44,74 p =,**0001**

Estadio 8		Estadio 30	
Sitios	p	sitios	p
3		3	1,000
4	1,000	4	1,000
5	1,000	5	0,009
6	1,000	6	0,030
7	1,000	7	0,094
8	0,049	8	1,000
10	0,049	9	1,000
11	1,000	10	1,000
12	1,000	11	0,860
13	1,000	12	0,008
15	0,049	13	1,000
16	1,000	15	0,390
17	1,000	16	0,094
18	1,000	17	0,118
19	0,405	18	1,000
		19	1,000

Tabla 34. Prueba de significancia Anova de anomalías para ensayos con *R. arenarum* en estadio 8-25-30 y la prueba a posteriori Dunnett.*

Estadio 8	Flexión de la cola: Fx	F(14, 72)=1,1878, p=,30338
	Intestino desplazado: Id	F(14, 72)=13,102, p=,00000
	Edema: E	F(14, 72)=3,4540, p=,00027
	Ausencia de quer.: Aq	F(14, 72)=7,4967, p=,00000
	Hipopigmentación: Hp	F(14, 72)=,88846, p=,57415
	Cuerpo asimétrico: Ca	F(14, 72)=,95764, p=,50404
	Ausencia de pico corneo: Apc	F(14, 72)=16,741, p=0,0000
Estadio 25	Intestino desplazado: Id	F(14, 72)=2,1871, p=,01636
	Edema: E	F(14, 72)=2,1871, p=,01636
	Ausencia de quer.: Aq	F(14, 72)=,90339, p=,55880
	Cuerpo cóncavo: Cc	F(14, 72)=,84653, p=,61768
	Flexión de la cola: Fx	F(14, 72)=,68855, p=,77810
Estadio 30	Flexión de la cola: Fx	F(15, 80)=1,4414, p=,14887
	Edema: E	F(15, 80)=1,2739, p=,23831
	Edema: E	F(15, 80)=3,7193, p=,00006
	Cuerpo cóncavo: Cc	F(15, 80)=1,0000, p=,46368
	Ausencia de quer.: Aq	F(15, 80)=,81973, p=,65307
	Hipopigmentación: Hp	F(15, 80)=,93333, p=,53173
	Intestino desplazado: Id	F(15, 80)=2,3734, p=,00701

Estadio 8					Estadio 25			Estadio 30		
Sitios	Id	Aq	E	fpc	Sitios	Id	E	Sitios	E	Id
3					3			3		
4	1,00	0,92	1,00	1,00	4	1,00	1,00	4	1,00	1,00
5	1,00	0,92	1,00	1,00	5	0,90	0,90	5	1,00	0,78
6	1,00	0,92	1,00	1,00	6	1,00	1,00	6	1,00	0,76
7	1,00	0,81	1,00	1,00	7	1,00	1,00	7	1,00	0,54
8	0,97	0,92	1,00	1,00	8	0,99	0,99	8	1,00	0,87
10	0,00	0,99	1,00	1,00	9	1,00	1,00	9	1,00	0,19
11	0,31	0,92	1,00	1,00	10	1,00	1,00	10	1,00	0,96
12	1,00	0,92	1,00	1,00	11	1,00	1,00	11	1,00	0,90
13	0,21	0,92	1,00	1,00	12	0,01	0,01	12	0,00	0,05
15	0,00	0,00	0,00	0,00	13	1,00	1,00	13	0,80	0,61
16	0,56	0,92	0,07	1,00	16	1,00	1,00	15	1,00	0,08
17	0,97	0,92	1,00	1,00	17	1,00	1,00	16	1,00	0,01
18	1,00	0,94	0,96	1,00	18	1,00	1,00	17	1,00	0,73
19	0,00	0,94	1,00	1,00	19	1,00	1,00	18	1,00	0,00
								19	1,000000	0,365762

Ensayo Crónico

Tabla 35- Tabla resumen Anova de mortalidad para ensayos con *R. arenarum* en ensayo crónico y la prueba a posteriori Dunnett.*

Día		SC	Gl	CM	F	p	Día 12	Día 54	Día 72	
		Intersec.								Sitios
12	Intersec.	114,64	1,00	114,64	1669,54	0,00	1	0,91	0,94	0,00
	sitio	4,89	10,00	0,49	7,13	0,00	3			
	Error	3,78	55,00	0,07			5	0,44	0,81	0,00
54	Intersec.	86,40	1,00	86,40	679,34	0,00	9	0,18	0,20	0,72
	sitio	4,73	10,00	0,47	3,72	0,00	11	0,76	0,18	0,38
	Error	7,00	55,00	0,13			12	0,81	0,77	0,76
72	Intersec.	30,98	1,00	30,98	271,50	0,00	15	0,00	0,00	0,04
	sitio	5,81	10,00	0,58	5,09	0,00	16	0,68	0,03	0,00
	Error	6,27	55,00	0,11			18	0,18	0,56	0,98
							20	0,00	0,10	0,17
							21	0,14	0,05	0,26

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 36- Tabla resumen Anova de crecimiento para ensayos con *R. arenarum* en ensayo crónico y la prueba a posteriori Dunnett.*

		SC	Gl	CM	F	p				
		<hr/>					Día	Día	Día	Día
		<hr/>					27	42	57	87
Día	sitio						p	p	p	p
27	Intersección	1,06	1,00	1,06	1045,31	0,00				
	Error	0,28	11,00	0,03	24,92	0,00				
		0,06	57,00	0,00						
42	Intersección	2,11	1,00	2,11	841,65	0,00				
	sitio	0,25	10,00	0,03	10,18	0,00				
	Error	0,13	51,00	0,00						
57	Intersección	1,83	1,00	1,83	102,31	0,00				
	sitio	0,32	10,00	0,03	1,78	0,00				
	Error	0,86	48,00	0,02						
87	Intersección	2,47	1,00	2,47	32,57	0,00				
	sitio	0,48	10,00	0,05	0,63	0,00				
	Error	3,26	43,00	0,08						

Sitios	Día 27 p	Día 42 p	Día 57 p	Día 87 p
1	0,68	0,24	1,00	0,58
3				
5	0,00	1,00	1,00	0,00
9	0,00	1,00	0,04	0,47
11	0,99	0,18	0,98	0,79
12	1,00	0,54	1,00	0,88
15	0,96	1,00	1,00	0,91
16	0,62	0,00	1,00	0,84
18	0,99	0,12	1,00	0,47
20	0,00	1,00	1,00	0,65
21	0,00	1,00	1,00	0,43

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p-valor

Ensayo con diluciones

Tabla 39- Tabla resumen Anova de mortalidad para ensayos con *R. arenarum* a en ensayos con diluciones y la prueba a posteriori Dunnett.*

		SC	Gl	CM	F	p	Desc.	
							Industrial	Cloacales
							Sitios	p
Industrial	Intersección	33,47	1,00	33,47	293,71	0,00		
	sitio	6,15	6,00	1,02	8,99	0,00		
	Error	3,19	28,00	0,11				
Descargas cloacaes	Intersección	26,03	1,00	26,03	865,62	0,00	0	
	sitio	4,49	6,00	0,75	24,89	0,00	6	0,64
	Error	0,42	14,00	0,03			12	0,60
							25	0,41
							50	0,00
							75	0,00
							100	0,00

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 40- Tabla resumen Anova de crecimiento para ensayos con *R. arenarum* en ensayos con diluciones y la prueba a posteriori Dunnett.*

		SC	Gl	CM	F	p	Industrial	
							Sitios	p
Industrial	Intersec.	1111,09	1,00	1111,09	3697,79	0,00		
	sitio	7,66	6,00	1,28	4,25	0,01	0	
	Error	6,61	22,00	0,30			6	0,579488
D. cloacales	Intersec.	32,34	1,00	32,34	262,65	0,00	12	0,272687
	sitio	0,58	6,00	0,10	0,78	0,60	25	0,005594
	Error	1,72	14,00	0,12			50	0,000080
							75	0,000008

*SC: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, CM cuadrados medios, F: prueba, p: p- valor

Tabla 41- Prueba de significancia Kruskals- Wallis variable desarrollo para ensayos con *R. arenarum* en ensayos con diluciones y la prueba a posteriori de comparación multiple*

Industrial- Kruskal-Wallis test: $H(6, N=29) = 21,27$ $p = 0,0016$

D. cloacales- Kruskal-Wallis test $H(6, N=179) = 10,12102$ $p = 0,1197$

sitios	p
0	
6	1,000
12	1,000
25	0,034
50	0,034
75	0,041
100	0,013

Tabla 42. Prueba de significancia Anova de anomalías para ensayos con *R. arenarum* en ensayos con diluciones y la prueba a posteriori Dunnett.*

Industrial	Flexión de la cola : Fx	F(6, 23)=,51275, p=,79247
	Cuerpo cóncavo: Cc	F(6, 23)=,81356, p=,57034
	Intestino desplazado: Id	F(6, 23)=2,0116, p=,10534
	Ausencia de quer. : Aq	F(6, 23)=46,157, p=,00000
Ausencia de pico corneo: Apc		F(6, 23)=5,9477, p=,00073
D. cloacales	Flexión de la cola : Fx	F(6, 13)=1,1762, p=,37631
	Cuerpo cóncavo: Cc	F(6, 13)=6,1147, p=,00313
	Intestino desplazado: Id	F(6, 13)=2,1216, p=,12041
	Ausencia de quer. : Aq	F(6, 13)=,82131, p=,57295
	Ausencia de pico corneo: Apc	F(6, 13)=,75833, p=,61471

Diluciones	Industrial		D.
	Aq	Apc	Cc
0			
6	0,88	0,88	1,00
12	0,88	0,88	1,00
25	0,02	0,88	1,00
50	0,00	0,72	1,00
75	0,00	0,01	0,00
100	0,00	0,00	