

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

## **RESPUESTAS A PLAGUICIDAS Y SU RELACIÓN CON LAS INTERACCIONES DEPREDADOR-PRESA EN ANFIBIOS (AMPHIBIA, ANURA) DE AGROECOSISTEMAS DEL LITORAL MESOPOTÁMICO DE ARGENTINA**

**Celina María Junges**

Directora de Tesis: Dra. Paola M. Peltzer

Co-director de Tesis: Dr. Rafael C. Lajmanovich

Laboratorio de Ecotoxicología - Escuela Superior de Sanidad – FBCB - UNL

**Dedicada a mis abuelas, Ana y Raquel**

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
Agradecimientos.....	vi
Publicaciones obtenidas durante el desarrollo del doctorado.....	viii
Presentaciones a congresos y eventos científicos realizados durante el desarrollo del doctorado.....	ix
Índice de tablas.....	xi
Índice de figuras.....	xiii
Abreviaturas.....	xvii
Resumen.....	xix
Abstract.....	xxii

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los anfibios y la depredación.....	1
1.2. Actividades agrícolas: impacto en los anfibios.....	4
1.3. Los anfibios, los agroquímicos y la depredación.....	6
1.4. Los anfibios como especies bioindicadoras.....	8
1.5. Biomarcadores.....	9
1.5.1. Biomarcadores etológicos.....	9
1.5.2. Biomarcadores enzimáticos.....	11

### 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis.....	14
2.2. Objetivos.....	14
2.2.1. Objetivo general.....	14
2.2.2. Objetivos específicos.....	14

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio y sitios de muestreo.....	15
3.2. Selección y descripción de las especies.....	17
3.2.1. Depredador.....	19
3.2.2. Presas.....	20

3.3. Recolección y acondicionamiento de depredadores y presas.....	22
3.4. Plaguicidas seleccionados .....	24
3.4.1. Fenitrothion .....	25
3.4.2. Glifosato .....	26
3.4.3. Trifloxistrobin .....	27
3.5. Diseño experimental.....	29
3.5.1. Primera etapa: Ecotoxicidad.....	29
3.5.1.1. <i>Procedimiento experimental</i> .....	30
3.5.2. Segunda etapa: Exposición de depredador y presa a los plaguicidas.....	31
3.5.2.1. <i>Parámetro de exposición</i> .....	31
3.5.2.2. <i>Procedimiento experimental</i> .....	32
3.5.3. Tercera etapa: Ensayos de depredación y evaluación de respuestas.....	34
3.5.3.1. <i>Ensayos de depredación directa</i> .....	35
3.5.3.1.1. Monitoreo de los organismos durante los ensayos de depredación ..	36
3.5.3.1.2. Análisis estadístico .....	37
3.5.3.2. <i>Evaluación de respuestas etológicas</i> .....	38
3.5.3.2.1. Análisis estadístico .....	39
3.5.3.3. <i>Evaluación de respuestas metabólicas</i> .....	40
3.5.3.3.1. Procesamiento de las muestras.....	40
3.5.3.3.2. Reactivos utilizados.....	41
3.5.3.3.3. Actividad de la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa.....	41
3.5.3.3.4. Análisis estadístico .....	41
3.5.4. Evaluación interespecífica de las variables analizadas .....	42

## 4. RESULTADOS

---

4.1. Ecotoxicidad.....	42
4.2. Exposición de depredador y presa a los plaguicidas .....	46
4.3. Ensayos de depredación directa .....	46
4.4. Monitoreo de los organismos durante los ensayos de depredación .....	55
4.4.1. Mortalidad .....	55
4.4.2. Lesiones.....	55
4.5. Evaluación de respuestas etológicas .....	58
4.6. Evaluación de respuestas metabólicas.....	75



4.6.1. Larvas de anfibios .....	75
4.6.2. Anguilas .....	91
4.7. Evaluación interespecífica de las variables analizadas .....	95
<b>5. DISCUSIÓN</b>	
<hr/>	
5.1. Ecotoxicidad.....	97
5.2. Exposición de depredador y presa a los plaguicidas.....	100
5.3. Ensayos de depredación directa .....	101
5.4. Monitoreo de los organismos durante los ensayos de depredación .....	104
5.5. Evaluación de respuestas etológicas .....	107
5.6. Evaluación de respuestas metabólicas.....	110
5.7. Evaluación interespecífica de las variables analizadas .....	116
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	118
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	120

## AGRADECIMIENTOS

En algún momento hay que poner el punto final a una tesis doctoral, y le ha llegado el turno a ésta. Por eso quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me animaron a gestar y dar a luz a este trabajo.

A mis directores, la Dra. Paola M. Peltzer y el Dr. Rafael C. Lajmanovich, porque siempre fueron fuente de conocimiento, orientación, paciencia, apoyo y amistad, y sobre todo, porque se animaron a ser pioneros, convencidos de presentar por primera vez a una alumna de la carrera Licenciatura en Saneamiento Ambiental de la Escuela Superior de Sanidad a una beca de CONICET y a el Doctorado en Ciencias Biológicas de la FBCB, sentando un precedente para mis queridos compañeros de la carrera.

A quien fue por un tiempo mi co-director de tesis, el Dr. Juan Carlos Sánchez-Hernández de la Universidad de Castilla-La Mancha, que a pesar de la distancia y los problemas económicos de nuestros países, siempre me brindó su apoyo.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCF-UNL), por brindar el marco académico para el desarrollo de la presente tesis, en especial a la Bioq. Adriana Ortolani y a todas las personas vinculadas a la Dirección de Posgrado de esta Facultad, que directa o indirectamente estuvieron acompañándome en el desarrollo de la carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas, las cuales me permitieron llevar a cabo mis tareas de investigación.

A todos los que hoy integran el Laboratorio de Ecotoxicología, porque con ellos amenizamos las horas de trabajo alrededor del mate, y porque no sólo me ayudaron en las tareas del laboratorio, sino que también estuvieron presente con sus múltiples consejos cuando por esas cosas de la vida, necesitaba unas palabras de aliento.

A Eduardo Lorenzatti y a Norberto Oldani, por brindarme sus conocimientos y por estar siempre presentes cuando los necesité.

A María Inés y a Andrea del Laboratorio de Inmunología Básica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas porque pusieron a disposición el lector de Elisa para las lecturas de las proteínas totales, y a Melina, Romina y Nazarena del Laboratorio de Tecnología Inmunológica por su entera predisposición.

A mis compañeras de ruta, Andrea, Daniela y Andrea, por el aguante!!!, y porque en colectivo o en auto, en las buenas y en las malas, siempre estuvieron presente!!

A Elena, Olga, Paula, Estela y Pamela por responder con paciencia las preguntas estadísticas surgidas en las diferentes etapas de la carrera.

A mis padres, Mirta y Aquiles, a mis hermanos, Daniel, Silvia y Elena, y a Rita, porque a pesar de no entender mucho lo que hago, siempre me acompañaron incondicionalmente, motivando cada esfuerzo.

A Gabriela, por las cervezas compartidas, preferentemente negra, y a Mariana por las picadas con maní, sin pororó.

A Eleonora, porque es una amigaza de aquellas que se encuentran poco en esta vida.

A Mauricio, por confiar en mi y permitirme crecer profesionalmente.

## PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DEL DOCTORADO

Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; **Junges, C.M.** (2009) *Inhibition and recovery of brain and tail cholinesterases of *Odontophrynus americanus* tadpoles (Amphibia: Cycloramphidae) exposed to fenitrothion*. J. Environ. Biol. 30(5): 923 - 926. Triveni Enterprises, India. ISSN: 0254-8704.

Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; **Junges, C.M.**; Attademo, A.M.; Sanchez, L.C.; Basso, A. (2010) *Activities levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River floodplain: Implication for ecological risk assessment of soybean crops*. Ecotox. Environ. Saf. 73(7): 1517 - 1524. Academis Press Inc Elsevier Science, San Diego. ISSN: 0147-6513.

**Junges, C.M.**; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Attademo, A.M.; Basso, 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): 1233 - 1238. Academis Press Inc Elsevier Science, Inglaterra. ISSN: 0045-6535.

Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; **Junges, C.M.**; Cabagna, M.C. (2011) *Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: b-esterases and glutathione s-transferase inhibitions*. Arch. Environ. Con. Tox. 60(4): 681 - 689. Springer, New York. ISSN (electrónico): 1432-0703.

Attademo, A.M.; Cabagna, M.C.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; **Junges, C.M.**; Bassó, A. (2011) *B-esterase's activities and blood cell's morphology in the Frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina)*. Ecotoxicology 20(1): 274 - 282. Springer, Netherlands. ISSN: 0963-9292

**Junges, C.M.**; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Cabagna-Zenklusen, M.C.; Basso, A. (2012) *Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction*. Chemosphere 87(11): 1348 - 1354. Academis Press Inc Elsevier Science, Inglaterra. ISSN: 0045-6535.

**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.; Zalazar, C.S. (2013) *Effectiveness evaluation of glyphosate oxidation employing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UVC process: toxicity assays with *Vibrio fischeri* and *Rhinella arenarum* tadpoles*. J. Environ. Sci. Heal. B. 48(3): 163-170.

## **PRESENTACIONES A CONGRESOS Y EVENTOS CIENTÍFICOS REALIZADOS DURANTE EL DESARROLLO DEL DOCTORADO**

**Junges, C. M.**; Lajmanovich; R.C.; Peltzer, P.M.; Attademo, A.M.; Bassó, A.; Cabagna Zenklusen, M. *Efecto del fenitrotion en las interacciones depredador-presa entre *Synbranchus marmoratus* e *Hypsiboas pulchellus**. X Congreso Argentino de Herpetología. 2009, Jujuy.

Attademo, A. M.; Cabagna Zenklusen, M. C.; Lajmanovich; R. C.; Peltzer, P. M.; **Junges, C. M.**; Fiorenza, G.; Basso, A. *B-esterasas y parámetros hematológicos en *Leptodactylus chaquensis* en cultivos de arroz*. X Congreso Argentino de Herpetología. 2009, Jujuy.

**Junges, C. M.**; Attademo, A. M.; Peltzer, P. M.; Lajmanovich, R. C.; Cabagna Zenklusen, M. C.; Lorenzatti, E. A. *Efecto del fungicida trifloxistrobin sobre la tasa de depredación en dos especies de anfibios anuros*. III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental, SETAC. 2010, Santa Fe.

**Junges, C. M.**; Attademo, A. M.; Peltzer, P. M.; Lajmanovich; R. C.; Cabagna Zenklusen, M. C.; Lorenzatti, E. A. *Sensibilidad de larvas de anfibios al fungicida trifloxistrobin*. XI Congreso Argentino de Herpetología. 2010, Buenos Aires.

**Junges, C. M.**; Attademo, A. M.; Peltzer, P. M.; Lajmanovich, R. C.; Cardell, L.; Vidal, E.; Negro, A.; Cassano, A.; Zalazar, C. *Evaluación biológica en larvas de *Rhinella arenarum* de muestras de glifosato tratadas por el proceso H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UVC como tecnología de remediación*. 2da. Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. 2011, San Juan.

**Junges, C. M.**; Peltzer, P. M.; Lajmanovich, R. C.; Attademo, A. M.; Cabagna Zenklusen, M. C. *Lesiones letales y subletales en larvas de anfibios producidas por*

*Synbranchus marmoratus* durante ensayos de depredación. 2da. Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. 2011, San Juan.

Attademo, A. M.; **Junges, C. M.**; Lajmanovich, R. C.; Peltzer, P. M.; Cabagna-Zenklusen, M. C.; Lorenzatti, E. A. *Efecto del fungicida trifloxistrobin sobre la actividad enzimática de la B-esterasa en larvas de Scinax nasicus (Amphibia: Anura)*. 2da. Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. 2011, San Juan.

**Junges, C. M.**; Peltzer, P. M.; Lajmanovich, R. C.; Attademo, A. M.; Cabagna-Zenklusen, M. C.; Bassó, A. *Exposición de larvas de anfibios a tres plaguicidas: efectos en el comportamiento*. XII Congreso Argentino de Herpetología. 2012, Mar del Plata.

## ÍNDICE DE TABLAS

---

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1:</b> Descripción de las características morfológicas de las larvas de anfibios utilizadas para todas las experiencias.....	<b>32</b>
<b>Tabla 2:</b> Concentraciones de exposición (en mg/l) a fenitrotion, glifosato y trifloxistrobin sobre las que se evaluaron los efectos en la interacción depredador-presa, respuestas etológicas y metabólicas en larvas de anfibios. Se muestran en color azul las concentraciones más bajas y en rojo las más altas de cada plaguicida a las que fue expuesta <i>Synbranchus marmoratus</i> (depredador), para evaluar las respuestas metabólicas.....	<b>33</b>
<b>Tabla 3:</b> Concentraciones letales para el 50% de la población (CL <sub>50</sub> , en mg/l) luego de 24 h de exposición a fenitrotion, glifosato y trifloxistrobin para las especies estudiadas se resaltan en negrita. Se muestran entre paréntesis los respectivos intervalos de confianza superior e inferior ( $\alpha = 0,05$ ) y los valores de NOEC y LOEC (en mg/l). .....	<b>43</b>
<b>Tabla 4:</b> Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de <i>Rhinella arenarum</i> para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80. ....	<b>60</b>
<b>Tabla 5:</b> Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de <i>Leptodactylus latrans</i> para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80. ....	<b>62</b>
<b>Tabla 6:</b> Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de <i>Leptodactylus chaquensis</i> para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.....	<b>64</b>
<b>Tabla 7:</b> Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de <i>Physalaemus albonotatus</i> para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.....	<b>66</b>
<b>Tabla 8:</b> Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de <i>Physalaemus santafecinus</i> para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.....	<b>68</b>
<b>Tabla 9:</b> Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de <i>Physalaemus riograndensis</i> para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.....	<b>70</b>
<b>Tabla 10:</b> Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de <i>Trachycephalus typhonius</i> para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.....	<b>72</b>

**Tabla 11:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Hypsiboas pulchellus* para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80. .... **74**

**Tabla 12:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Elachistocleis bicolor* para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80. .... **75**



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Área de estudio y sitios de muestreo. ....	17
<b>Figura 2:</b> Especies seleccionadas para el desarrollo de la presente tesis.....	19
<b>Figura 3:</b> Mantenimiento de los organismos hasta su empleo en ensayos de depredación y evaluación de respuestas, A y B: bajo condiciones de mesocosmos en tanques de plástico; C y D: bajo condiciones controladas de laboratorio en peceras de vidrio.....	23
<b>Figura 4:</b> Esquema del diseño utilizado para los ensayos de depredación (24 h). ....	36
<b>Figura 5:</b> Registro del comportamiento de las larvas de anfibios mediante filmaciones. ....	38
<b>Figura 6:</b> Esquema representativo del diseño experimental utilizado para cuantificar la respuesta etológica de las especies presa, expuestas y no expuestas a los plaguicidas. ....	39
<b>Figura 7:</b> Valor crítico para el 5% de las especies de anuros (HC5) estimado mediante distribución BurrIII de BurliOz, que asegura la protección del 95% de las especies frente a una potencial exposición al insecticida fenitrotion. ....	44
<b>Figura 8:</b> Valor crítico para el 5% de las especies de anuros (HC5) estimado mediante distribución BurrIII de BurliOz, que asegura la protección del 95% de las especies frente a una potencial exposición al herbicida glifosato. ....	45
<b>Figura 9:</b> Valor crítico para el 5% de las especies de anuros (HC5) estimado mediante distribución BurrIII de BurliOz, que asegura la protección del 95% de las especies frente a una potencial exposición al fungicida trifloxistrobin.....	45
<b>Figura 10:</b> Anguilas durante la fase de exposición. ....	46
<b>Figura 11:</b> Ensayos depredador-presa llevados a cabo en la sala de bioensayos. ....	47
<b>Figura 12:</b> Tasa de depredación sobre las diferentes especies de larvas de anfibios anuros a 1 h. ....	48
<b>Figura 13:</b> Efecto de los diferentes tratamientos y plaguicidas sobre la tasa de depredación de larvas de anfibios a 1 h.....	48
<b>Figura 14:</b> Tasa de depredación sobre las diferentes especies de larvas de anfibios anuros a las 6 h.....	49
<b>Figura 15:</b> Efecto de los diferentes tratamientos y plaguicidas sobre la tasa de depredación de larvas de anfibios a las 6 h. ....	50
<b>Figura 16:</b> Tasa de depredación sobre las diferentes especies de larvas de anfibios anuros a las 18 h....	51
<b>Figura 17:</b> Efecto de los diferentes tratamientos y plaguicidas sobre la tasa de depredación de larvas de anfibios a las 18 h. ....	52
<b>Figura 18:</b> Tasa de depredación sobre las diferentes especies de larvas de anfibios anuros a las 24 h....	53
<b>Figura 19:</b> Efecto de los diferentes tratamientos y plaguicidas sobre la tasa de depredación de larvas de anfibios a las 24 h. ....	53

<b>Figura 20:</b> Renacuajos expuestos (R+) y no expuestos (R-) a los plaguicidas consumidos por las anguilas durante los ensayos de depredación.....	<b>54</b>
<b>Figura 21:</b> Tasa de depredación de las anguilas expuestas (A+) y no expuestas (A-) a los plaguicidas durante los ensayos de depredación.....	<b>55</b>
<b>Figura 22:</b> Lesiones con efectos letales (A, B, C, E, H, I y J) y subletales (D, F y G) observadas en las larvas de anfibios durante los ensayos de depredación.....	<b>56</b>
<b>Figura 23:</b> Porcentaje de lesiones letales y subletales observadas en larvas de anfibios producidas por las anguilas durante los intentos de captura de sus presas. ....	<b>58</b>
<b>Figura 24:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de <i>Rhinella arenarum</i> . ....	<b>59</b>
<b>Figura 25:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de <i>Rhinella arenarum</i> . ....	<b>59</b>
<b>Figura 26:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de <i>Leptodactylus latrans</i> . ....	<b>61</b>
<b>Figura 27:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de <i>Leptodactylus latrans</i> . ....	<b>61</b>
<b>Figura 28:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de <i>Leptodactylus chaquensis</i> . ....	<b>63</b>
<b>Figura 29:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de <i>Leptodactylus chaquensis</i> . ....	<b>63</b>
<b>Figura 30:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de <i>Physalaemus albonotatus</i> . ....	<b>65</b>
<b>Figura 31:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de <i>Physalaemus albonotatus</i> . ....	<b>65</b>
<b>Figura 32:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de <i>Physalaemus santafecinus</i> . ....	<b>67</b>
<b>Figura 33:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de <i>Physalaemus santafecinus</i> . ....	<b>67</b>
<b>Figura 34:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de <i>Physalaemus riograndensis</i> . ....	<b>69</b>
<b>Figura 35:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de <i>Physalaemus riograndensis</i> . ....	<b>69</b>
<b>Figura 36:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de <i>Trachycephalus typhoni</i> . ....	<b>71</b>
<b>Figura 37:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de <i>Trachycephalus typhoni</i> . ....	<b>71</b>

<b>Figura 38:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de <i>Hypsiboas pulchellus</i> .	73
<b>Figura 39:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de <i>Hypsiboas pulchellus</i> .	73
<b>Figura 40:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de <i>Elachistocleis bicolor</i> .	74
<b>Figura 41:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de <i>Elachistocleis bicolor</i> .	75
<b>Figura 42:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> .	77
<b>Figura 43:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de <i>Rhinella arenarum</i> .	77
<b>Figura 44:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de <i>Leptodactylus latrans</i> .	79
<b>Figura 45:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de <i>Leptodactylus latrans</i> .	79
<b>Figura 46:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de <i>Leptodactylus chaquensis</i> .	80
<b>Figura 47:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de <i>Leptodactylus chaquensis</i> .	81
<b>Figura 48:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de <i>Physalaemus albonotatus</i> .	82
<b>Figura 49:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de <i>Physalaemus albonotatus</i> .	82
<b>Figura 50:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de <i>Physalaemus santafecinus</i> .	83
<b>Figura 51:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de <i>Physalaemus santafecinus</i> .	84
<b>Figura 52:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de <i>Physalaemus riograndensis</i> .	85
<b>Figura 53:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de <i>Physalaemus riograndensis</i> .	85
<b>Figura 54:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de <i>Trachycephalus typhonius</i> .	86
<b>Figura 55:</b> Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de <i>Trachycephalus typhonius</i> .	87

**Figura 56:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Hypsiboas pulchellus*. ..... 88

**Figura 57:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Hypsiboas pulchellus*. ..... 89

**Figura 58:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Elachistocleis bicolor*. ..... 90

**Figura 59:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Elachistocleis bicolor*. ..... 90

**Figura 60:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en músculo de juveniles de *Synbranchus marmoratus* bajo la exposición a las concentraciones más bajas de plaguicidas. .... 92

**Figura 61:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en músculo de juveniles de *Synbranchus marmoratus* bajo la exposición a las concentraciones más bajas de plaguicidas. .... 92

**Figura 62:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en músculo de juveniles de *Synbranchus marmoratus* bajo la exposición a las concentraciones más altas de plaguicidas. .... 94

**Figura 63:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en músculo de juveniles de *Synbranchus marmoratus* bajo la exposición a las concentraciones más altas de plaguicidas. .... 94

**Figura 64:** Fenograma de similitud entre las diferentes especies de anfibios según características morfológicas, ecotoxicológicas y variables-respuesta (depredación, comportamentales y metabólicas) bajo la exposición al insecticida fenitrotion (Método UPGMA). ..... 95

**Figura 65:** Fenograma de similitud entre las diferentes especies de anfibios según características morfológicas, ecotoxicológicas y variables-respuesta (depredación, comportamentales y metabólicas) bajo la exposición al herbicida glifosato (Método UPGMA). ..... 96

**Figura 66:** Fenograma de similitud entre las diferentes especies de anfibios estudiadas según características morfológicas, ecotoxicológicas y variables-respuesta (depredación, comportamentales y metabólicas) bajo la exposición al fungicida trifloxistrobin (Método UPGMA). ..... 97

**Figura 67:** Posibles secuencias de interacciones entre depredador y presa que pueden dar origen a los efectos de consumo y de no consumo. .... 105

**ABREVIATURAS**

<b>A+</b>	Anguilas expuestas a plaguicidas
<b>A-</b>	Anguilas no expuestas a plaguicidas
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>a.i.</b>	Ingrediente activo
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>BChE</b>	Butirilcolinesterasa
<b>Cl<sub>50</sub></b>	Concentración letal 50
<b>cm</b>	Centímetro
<b>col.</b>	Colaboradores
<b>ds</b>	Desvío estándar
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
<b>e.g.</b>	Por ejemplo
<b>etc.</b>	Etcétera
<b>es</b>	Error estándar
<b>F</b>	Fenitrothion
<b>g</b>	Gramo
<b>FBCB-UNL</b>	Facultad de Bioquímica y Ciencias biológicas de la Universidad Nacional del Litoral
<b>Gly</b>	Glifosato
<b>h</b>	Hora
<b>H-TP</b>	Longitud hocico-base del tubo proctodeal
<b>l</b>	Litro
<b>Ln</b>	Logaritmo natural
<b>LOEC</b>	Concentración mas baja de efecto observado
<b>LT</b>	Longitud total
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MC</b>	Masa corporal
<b>mg/l</b>	Miligramos por litro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>N</b>	Número Total
<b>NOEC</b>	Concentración mas alta de efecto no observado
<b>PT</b>	Proteínas totales

<b>R+</b>	Renacuajos expuestos a plaguicidas
<b>R-</b>	Renacuajos no expuestos a plaguicidas
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TFS</b>	Trifloxistrobin
<b>US.EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (del inglés United Stated Environmental Protection Agency)
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µmol</b>	Micromol
<b>%</b>	Por ciento
<b>®</b>	Marca registrada
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>&gt;</b>	Mayor que
<b>°C</b>	Grados Celcius

## RESUMEN

En los últimos años, se ha puesto en evidencia que la presencia ambiental de estresores antropogénicos o xenobióticos, como los plaguicidas, está relacionada con efectos indirectos en los anfibios que se manifiestan a nivel de comunidad. Una explicación posible a este fenómeno podría atribuirse a que la incorporación de estos estresores en los ecosistemas no es la suficiente para causar la muerte fisiológica de los organismos, pero sí capaz de afectar su funcionamiento en un contexto ecológico, efecto conocido como muerte ecológica. Existe una amplia variedad de biomarcadores que se utilizan para detectar de manera precoz los efectos adversos de los xenobióticos sobre los anfibios, entre los que se pueden citar las respuestas etológicas o comportamentales, y las enzimáticas o metabólicas.

En función de lo anteriormente expuesto, es que se propuso analizar experimentalmente las interacciones depredador-presa entre distintas especies de larvas de anfibios y un pez depredador del litoral mesopotámico argentino, y establecer su relación con las variaciones en las respuestas etológicas (actividad natatoria y respiración o *bubbling*) de las presas y metabólicas (actividad de las enzimas acetilcolinesterasa [AChE] y butirilcolinesterasa [BChE]) de depredador y presas en presencia de concentraciones subletales de tres plaguicidas: fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS).

Para la realización de las experiencias se seleccionó a *Synbranchus marmoratus* como depredador y a nueve especies de larvas de anfibios como presas: *Rhinella arenarum* (Bufonidae), *Leptodactylus latrans*, *L. chaquensis* (Leptodactylidae), *Physalaemus santafecinus*, *P. albonotatus*, *P. riograndensis* (Leiuperidae), *Trachycephalus typhoni*, *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) y *Elachistocleis bicolor* (Microhylidae). Bajo condiciones controladas de laboratorio, se llevaron a cabo las experiencias que fueron organizadas en tres etapas: la primera de ecotoxicidad, la segunda de exposición, y la tercera de ensayos de depredación y evaluación de respuestas etológicas y metabólicas.

La primera etapa consistió en evaluar la toxicidad de las larvas de anfibios frente a formulaciones comerciales de los plaguicidas F, Gly y TFS, para de esta manera establecer las concentraciones subletales de exposición a emplear en la evaluación de respuestas. En una segunda etapa, se realizó la exposición de depredador y presas a concentraciones subletales de los tres plaguicidas y a agua declorinada con la intención de clasificar a depredador y presas en dos tratamientos: expuestos a cada uno de los plaguicidas (F, Gly y TFS) y no expuestos al plaguicida. Finalmente, tras la exposición de los organismos, se llevaron a cabo ensayos de depredación directa utilizando combinaciones de tratamientos que incluyeron depredador y

presas expuestas y no expuestas a plaguicidas, sobre los cuales se evaluaron y contrastaron las respuestas etológicas y metabólicas. Posteriormente, se examinaron de manera conjunta variables morfológicas, ecotoxicológicas y de respuesta (tasa de depredación, etológicas y metabólicas) a la exposición a cada los plaguicidas, con la finalidad de encontrar similitudes entre las diferentes especies de anfibios estudiadas.

La etapa de ecotoxicidad permitió demostrar que la toxicidad ( $CL_{50-24h}$ ) varió entre los agroquímicos evaluados, siendo más tóxico para las larvas de anfibios el fungicida TFS. A su vez, la especie *E. bicolor* fue la más sensible a los tres plaguicidas, mientras que *T. typhonius* fue la más tolerante a F, *L. chaquensis* a Gly e *H. pulchellus* a TFS.

Para garantizar que la exposición de depredador y presa a los plaguicidas F, Gly y TFS fuera bajo condiciones subletales, se seleccionó como concentración de exposición a la concentración experimental más baja en la que se observaron efectos adversos en las presas (LOEC-presa), y se estableció un período de exposición de seis horas.

En los ensayos de depredación directa, el tratamiento donde depredador y presas no fueron expuestos a plaguicidas (A-R-) presentó las mayores tasas de depredación, mientras que el tratamiento donde depredador y presas fueron simultáneamente expuestos a los plaguicidas (A+R+) presentó las menores tasas de depredación. Estos resultados indican que la interacción depredador-presa fue alterada por un corto tiempo de exposición subletal a los plaguicidas F, Gly y TFS, y que además, dicha interacción fue sesgada en favor de las larvas de anfibios expuestas a los plaguicidas, ya que fueron significativamente menos depredadas por las anguilas.

Además de los efectos de consumo por depredación, las larvas de anfibios fueron lesionadas letal o subletalmente por las anguilas, siendo la región del cuerpo donde se localizó la agresión determinante del tipo de lesión producida. A su vez, la exposición de las larvas de anfibios a los plaguicidas incrementó el número de lesiones con efectos letales.

Las respuestas etológicas fueron alteradas en las larvas de anfibios expuestas a los plaguicidas, siendo la reducción de la actividad natatoria y la respiración las respuestas más observadas entre los renacuajos expuestos a los plaguicidas. A su vez, se observó una correlación positiva entre ambos parámetros, lo cual indica que si la actividad natatoria se incrementa, mayor es la demanda de oxígeno atmosférico.

Para las nueve especies de larvas de anfibios, las respuestas metabólicas fueron alteradas en sus niveles normales por la exposición a F, Gly y TFS, siendo la BChE más sensible como biomarcador que la AChE frente a la exposición a los plaguicidas. En *S. marmoratus*, los niveles



enzimáticos también respondieron a la exposición a los plaguicidas, alterando la actividad de la AChE y la BChE.

Por último, las asociaciones de similitud interespecíficas de las nueve especies de anuros en base a características morfológicas, ecotoxicológicas y a variables de respuesta (depredación, comportamentales y metabólicas) frente a la exposición a plaguicidas, indicaron que las larvas de anfibios desarrollan diferentes respuestas para evitar ser depredadas, las que pueden ser afectadas por factores externos, internos y filogenéticos, que actúan de manera conjunta para maximizar su supervivencia.

En conclusión, este estudio demostró que los plaguicidas F, Gly y TFS alteraron la interacción depredador-presa entre juveniles de *S. marmoratus* y larvas prometamórficas de anfibios del litoral mesopotámico argentino, interfiriendo sobre las respuestas etológicas de las presas y metabólicas de depredador y presas. Sin embargo, estas modificaciones no necesariamente pueden ser siempre relacionadas con un aumento en la mortalidad de los individuos por depredación, ya que en este trabajo de tesis, el resultado final de la interacción depredador-presa fue sesgado en favor de las larvas de anfibios expuestas a los plaguicidas. Además, se puso en evidencia que el conocimiento de la bioecología de las larvas de anfibios anuros está estrechamente relacionada con la conservación de este grupo, ya que cualquier disturbio producido en el ambiente, incidiría en la supervivencia de las mismas, afectando a cada una de las especies en diferente magnitud.

## ABSTRACT

In the last few years it was proved that the presence of anthropogenic stressors or xenobiotics like pesticides is related to indirect effects in amphibians that are expressed in a community level. One possible explanation to this phenomenon could be that the addition of these stressors to the ecosystems is not enough to cause the physiological death of these organisms but it does affect its function in an ecological context, effect known as ecological death. There is a wide variety of biomarkers used to detect early adverse effects of xenobiotics on amphibians, such as ethological or behavioral responses as well as those enzymatic or metabolic.

In connection with the previously exposed, we proposed to experimentally analyze the predator-prey interaction between different species of tadpoles and a predator fish from the Mesopotamic Littoral region of Argentina, and to establish their relationship with the variations in ethological responses from prey (swimming activity and breathing or bubbling) as well as metabolic ones (enzymatic activity of acetylcholinesterase [AChE] y butyrylcholinesterase [BChE]) from both, prey and predator, in the presence of sublethal concentrations of three different pesticides: Fenitrothion (F), Glyphosate (Gly) and Trifloxystrobin (TFS).

To carry out the experiments we selected *Synbranchus marmoratus* as predator and nine amphibian species larvae as prey: *Rhinella arenarum* (Bufonidae), *Leptodactylus latrans*, *L. chaquensis* (Leptodactylidae), *Physalaemus santafecinus*, *P. albonotatus*, *P. riograndensis* (Leiuperidae), *Trachycephalus typhonius*, *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) y *Elachistocleis bicolor* (Microhylidae). The experiments were done under controlled laboratory conditions and organized in three stages: firstly, ecotoxicity, secondly, exposition, and last but not least, testing and evaluation of ethological or metabolic responses.

The first stage consisted of evaluating the sensitivity of amphibian larvae to the commercial formulation of pesticides such as F, Gly and TFS, thus to determine the sublethal concentration to be used in the evaluation response. In the second stage we exposed predator and prey to their respective sublethal concentrations and to dechlorinated water in order to classify predator and prey in two treatments: exposed to pesticides (F, Gly and TFS) and not exposed. Finally, after the organisms' exposition, we conducted direct predation tests using treatment combinations that included pesticide exposed and not exposed predators and preys, on which ethological and metabolical responses were evaluated and contrasted. Later, we examined

morphological, ecotoxicological and response (predation rate, ethological and metabolic) variables together to search for similarities among the different species studied.

The ecotoxicity stage let us demonstrate that toxicity ( $CL_{50-24h}$ ) fluctuated between the evaluated agrochemicals, being TFS the most toxic to amphibians larvae. In addition, *E. bicolor* was the most sensitive to the three pesticides while *T. typhonius* was the most tolerant to F, as *L. chaquensis* was to Gly, and *H. pulchellus* to TFS.

To guarantee that the exposition of predator and prey to pesticides F, Gly and TFS were under sublethal conditions, we selected the lowest experimental concentration where adverse effects on prey (LOEC-prey) were observed as the exposition concentration, and we established a six hours period of exposition.

In the direct predation test, the treatment where predator and prey were not exposed to pesticides (A-R-) exhibited the highest predation rates, while the treatment where predator and prey were simultaneously exposed to pesticides (A+R+) presented the lowest predation rates. These results indicate that predator-prey interaction was altered by a short time exposure to sublethal concentrations of F, Gly and TFS, and that that interaction was biased in favor of the amphibians larvae exposed to pesticides since they were significantly less predated by the eels.

In addition to the effects of consumption by predation, the amphibian larvae were lethally or sublethally injured by the eels, being the body where the determining aggression of the produced injury was located. Furthermore, the exposition to pesticides of the amphibian's larvae increased the number of injuries with lethal effects.

The ethological responses were altered in amphibians larvae exposed to the pesticides, being the reduction of swimming activity and breathing the most frequent responses observed in pesticide-exposed tadpoles. Moreover, a positive correlation was observed between both parameters which indicate that if swimming activity increases, the demand of atmospheric oxygen increases as well.

For the nine species of amphibian larvae, the metabolic responses were altered in their normal levels by the exposition to F, Gly and TFS, being BChE more sensitive as biomarker than AChE when exposed to pesticides. In *S. marmoratus*, the enzymatic levels also responded to the exposition to pesticides, altering the activity of AChE and BChE.

Finally, the associations of interspecific similarities of the nine anuran species based on morphological and ecotoxicological characteristics and on response variables (predation, behavioral and metabolic) to pesticide exposition indicated that the amphibian larvae develop different responses to avoid being predated, and those can be affected by external, internal and phylogenetic factors that act together to maximize their survival.

In conclusion, this study demonstrated that pesticides F, Gly and TFS altered the predator-prey interaction between *S. marmoratus* juveniles and prometamorphic larvae of amphibians from the Argentinean Mesopotamic littoral, interfering on preys' ethological responses and preys and predators' metabolic responses. However, these modifications cannot be necessarily related to an increase in mortality by predation, since the final result of this thesis was biased in favor of the amphibian larvae exposed to pesticides. Moreover, it became more evident that the knowledge of the bioecology of anuran larvae is directly related to the conservation of this group since any disturbance produced in the environment could influence on their survival, thus affecting each species in a different magnitude.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Dentro de un ecosistema la depredación juega un rol clave, generando procesos coevolutivos complejos capaces de modificar la distribución espacial y temporal de los organismos y determinar la estructura y dinámica de las tramas tróficas (Begon y col., 1996). En otras palabras, la depredación es el consumo de un organismo (la presa) por parte de otro organismo (el depredador), estando la presa viva cuando el depredador ataca. Esta interacción involucra una transferencia de energía entre seres vivos y constituye una interacción directa y compleja entre dos o más especies, donde cada una de ellas puede influir sobre el crecimiento poblacional de la otra, y favorecer el establecimiento de nuevas adaptaciones.

Sin embargo, la depredación es tan sólo uno de los muchos factores que modifican el equilibrio de las comunidades acuáticas. La presencia de sustancias químicas no naturales de origen antrópico, conocidas como xenobióticos (Repetto, 1995), solas o combinadas a bajas concentraciones ya están produciendo efectos indirectos sobre los distintos grupos taxonómicos de las comunidades acuáticas (Relyea, 2009). Los primeros intentos de evaluar los efectos tóxicos a mediano y largo plazo de estos compuestos fueron a partir de ensayos ecotoxicológicos. Es decir, experimentos reproducibles realizados bajo condiciones controladas de laboratorio sobre una sola especie, como bacterias marinas luminiscentes (*Vibrio fischeri*) y pulgas de agua (*Daphnia magna*), con ciclos de vida cortos y que además, responden rápidamente a las perturbaciones ambientales (Girotti y col., 2008). Aunque se trata de la aplicación de protocolos estandarizados para identificar rápidamente los impactos directos de los xenobióticos sobre los organismos (Relyea y Diecks, 2008), los resultados no pueden extrapolarse en forma directa a niveles de organización biológica más altos y difícilmente permitan establecer interpretaciones acordes a la realidad. A partir de entonces, la necesidad de ajustar diseños experimentales existentes y la búsqueda de herramientas metodológicas adecuadas, sea por su representatividad de los procesos naturales, por su sensibilidad o facilidad de empleo, constituye uno de los principales lineamientos de la ecotoxicología actual (Rand y Petrocelli, 1985) y la principal justificación del desarrollo de la presente tesis.

### 1.1. Los anfibios y la depredación

Los anfibios son eslabones importantes en el flujo de energía dentro de los ecosistemas acuáticos y terrestres (Stebbins y Cohen, 1995). En general, los anfibios anuros pasan la primera

parte de su vida como herbívoros acuáticos y la última parte, como carnívoros terrestres. La etapa larval de los anuros está dedicada exclusivamente al crecimiento y la supervivencia, mientras que en la etapa adulta se llevan a cabo principalmente eventos de reproducción, dispersión y supervivencia (Wilbur, 1980). En la mayoría de los casos, la etapa larval experimenta altas tasas de mortalidad, debido a una amplia gama de factores, incluyendo la desecación de los cuerpos de agua, la contaminación (Greulich y Pflugmacher, 2003), la competencia (Brönmark y col., 1991) y la depredación (Nomura y col., 2011). Sin embargo, la depredación ha sido reconocida como la principal causa de mortalidad, y uno de los factores reguladores de la estructura de las comunidades larvales, tanto en su composición como en su distribución (Semlitsch y Gibbons, 1988; Azevedo-Ramos y col., 1999). Las larvas de anfibios son vulnerables a distintas especies de depredadores invertebrados y vertebrados. Entre los depredadores invertebrados más frecuentes se encuentran los insectos acuáticos (larvas de odonatos y de coleópteros, hemípteros belostomatídeos y notonécidos) y entre los vertebrados, los peces. Los insectos acuáticos son depredadores considerablemente voraces y presentan tácticas depredatorias eficaces; sin embargo, debido a su menor movilidad y limitación para manejar presas de gran tamaño, no son capaces de reducir las poblaciones de larvas de anfibios hasta la extinción (Kopp y col., 2006; Fulan y Almeida, 2010). A diferencia de los insectos acuáticos, los peces poseen mayor capacidad natatoria y tácticas más eficientes de depredación, por lo que son considerados los principales reguladores de larvas de anfibios en ambientes acuáticos (Heyer y col., 1975; Petranka, 1983; Wilbur, 1987; Semlitsch, 1993; Hero y col., 1998), llevando en algunos casos a la completa extinción de las poblaciones (Kats y Ferrer, 2003; Kloskowski, 2009).

Si bien es ampliamente reconocido que los peces depredan activamente sobre las larvas de los anfibios, se han reportado numerosos casos de coexistencia (Hero y col., 2001; Teplitsky y col., 2003). Esto sugiere que los renacuajos son capaces de desarrollar mecanismos de defensa (de comportamiento, fisiológicos o morfológicos) efectivos para reducir los eventos de captura, y de esta manera, evitar su depredación. Por ejemplo, la presencia de sustancias tóxicas en la piel y su concomitante no-palatabilidad, ha sido citada en repetidas ocasiones como un mecanismo para desalentar la depredación por los peces (Wassersug, 1971; Lawler y Hero, 1997; Alstyne, 2001; Jara y Perotti, 2006). El comportamiento gregario que suelen presentar algunas especies, como por ejemplo *Leptodactylus latrans* (Vaz-Ferreira y Gehrau, 1975), puede ser citado como otro mecanismo para reducir el riesgo a la depredación. En estos casos, se sostiene que los depredadores tienen mayores probabilidades de cometer errores (efecto confusión) cuando intentan capturar a una presa que se desplaza dentro un grupo (Nicieza, 1999;

Spieler, 2003; Whitfield, 2003; Abrahams y col., 2009). La coloración críptica también es un rasgo que ayuda a algunas especies de renacuajos a pasar desapercibidos por presentar una coloración semejante a la del ambiente (Blair y Wassersug, 2000; Nomura y col., 2011). Otro mecanismo a considerar es la selección del microhábitat dentro de una laguna. En otras palabras, que dependiendo del microhábitat donde se encuentren las larvas de anfibios, variará también la efectividad de los depredadores en la localización y captura de sus presas. La reducción en el nivel de actividad es el comportamiento de defensa más generalizado observado en las larvas de anfibios en presencia de diferentes depredadores (Skelly, 1994; Anholt y Werner, 1995; Richardson, 2001; Takahara y col., 2008).

Particularmente, las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, presentan valores elevados de diversidad de anfibios de Argentina, dados por la gran variedad de biotopos y hábitats complejos que se encuentran asociados al valle aluvial del río Paraná. A modo de ejemplo, solo en las áreas riparias del río Paraná Medio, habitan 34 especies de anfibios anuros distribuidas en seis familias: Bufonidae, Leptodactylidae, Cycloramphidae, Ceratophryidae, Hylidae y Microhylidae (Bridarolli y di Tada, 1994; Lajmanovich, 2000; Peltzer y Lajmanovich, 2004; 2007). Asimismo, el tramo medio del río Paraná presenta una alta diversidad de especies ícticas (Ringuelet y col., 1967). A lo largo del cauce principal del río, se desplazan principalmente especies migradoras, en su mayoría de valor comercial. La más importante es *Prochilodus lineatus* (sábalo), detritívoro, que constituye aproximadamente el 50% de la biomasa de los peces de gran porte (Oldani y Oliveros, 1984; Tablado y col., 1988). Los cuerpos leníticos se caracterizan por la presencia de *Hoplias malabaricus malabaricus* (dientudo), un gran depredador adaptado a ambientes de escasa profundidad y de *Loricariidae* (viejas de agua). Durante los períodos de anegamiento periódico producido por el desborde lateral de ríos y lagunas y/o por la precipitación directa, la llanura de inundación representa un refugio para los juveniles de las grandes especies de peces contra de depredación que existe en el cauce, y otorga condiciones favorables de corriente, temperatura y de alimentación para el desarrollo de los huevos y larvas de varias especies de peces (Bayley, 1988; Welcome, 1992; Sánchez-Botero y Araújo-Lima, 2001; Petry y col., 2003). De esta manera el pulso de inundación genera un notable incremento en la abundancia de peces de pequeño y mediano porte en los ambientes someros y vegetados de la llanura de inundación (Cordiviola de Yuan, 1992; Rossi y Parma, 1992). Cuando baja el nivel de las aguas, algunos peces permanecen en pantanos y en lagunas cercanas al río, mientras que otros mueren cuando éstas se desecan. En condiciones leníticas, las lagunas aisladas poseen una extensa cobertura de hidrófitas flotantes (Lowe-McConnell, 1975) y también numerosas especies de peces adaptadas a estas condiciones (Ward, 1998). Entre esas se

encuentra *Synbranchus marmoratus*, cuyo nombre vulgar es anguila criolla, caracterizada como una especie típica de aguas lénticas (Kullander, 2003).

Al considerar que los peces son los depredadores dominantes de los ambientes acuáticos del valle de inundación, tanto en biomasa como en abundancia; y que su presencia en las lagunas está asociada al fenómeno pulsátil del río Paraná (Bonetto y col., 1969; Junk y col., 1989; Scarabotti y col., 2011), se estima que la interacción entre ambos factores podría condicionar la supervivencia de las poblaciones de larvas de anfibios en estos sitios, favorecida por el ingreso de peces depredadores a los ambientes acuáticos donde la herpetofauna se reproduce.

## **1.2. Actividades agrícolas: impacto en los anfibios**

Durante las décadas de 1980-90 se impuso y consolidó en Argentina un modelo de agronegocios (Sili, 2010) caracterizado por una matriz tecnológica moderna enmarcada por cultivos transgénicos, siembra directa, mayor uso de fertilizantes y plaguicidas, y en mayor medida, por prácticas asociadas a la agricultura de precisión (Satorre, 2005; Viglizzo y col., 2010). Estos cambios ocurrieron a expensas de áreas de bosques y pastizales naturales del Chaco, del Noroeste y Noreste argentino (Paruelo y col., 2006; Gasparri y Grau, 2009), que se transformaron en ecosistemas artificiales simplificados en biodiversidad, que requieren de la continua intervención humana ya que carecen de capacidad para realizar su propia regulación. Esta pérdida de heterogeneidad ambiental trajo aparejada una disminución significativa de biodiversidad a nivel local como regional (Hillebrand y col., 2008; Oesterheld, 2008; Gavier-Pizarro y col., 2011), subsistiendo sólo aquellas especies capaces de ajustarse a la vida en mosaicos agrícolas o mixtos (Tscharntke y col., 2005; Dardanelli y col., 2006; Schrag y col., 2009).

La conversión de tierras naturales a agricultura, particularmente en el centro-este de Santa Fe y centro-oeste de Entre Ríos, ha transformado los ambientes del río Paraná Medio en tierras de alto desarrollo agrícola. Actualmente, sólo pueden encontrarse remanentes de vegetación nativa, que varían en su grado de conectividad y antropización, asociados a las barrancas del río Paraná en sitios menos afectados por la expansión agropecuaria debido a su carácter de zonas inundables y de poca importancia económica (Peltzer y col., 2006). Es en este contexto que se plantea que el avance de la agricultura sobre fragmentos boscosos y sus actividades (e.g. deforestación y aplicación de agroquímicos) constituyen los principales factores que estarían afectando la supervivencia de los anfibios anuros de la región.



En este sentido, toman particular importancia numerosos estudios llevados a cabo en áreas de influencia del valle de inundación del río Paraná Medio, que evaluaron el efecto de la fragmentación y la pérdida de hábitats sobre la dinámica de los anfibios anuros (Peltzer y Lajmanovich, 2001; 2004; Peltzer y col., 2003; 2005; 2008) y la comunidad de anfibios en remanentes forestales (Lajmanovich y Peltzer, 2001; Peltzer y Lajmanovich, 2007). En líneas generales, los resultados de estos trabajos indicaron que la diversidad, composición y distribución de los anuros en ambientes fragmentados responden a la influencia de variables locales (físico-químicas, biológicas y temporales) del paisaje (composición y estructura). La influencia de la matriz agrícola, particularmente campos de soja de Entre Ríos y Santa Fe, y su relación con las respuestas a nivel ecológico de la fauna de anuros también fue estudiada (Peltzer y col., 2006). Los resultados hallados fueron similares a los observados en otras regiones de Argentina sobre la capacidad de los agroecosistemas de soportar un gran número de individuos de ciertas especies con hábitos particulares (e.g. Bionda y col., 2011), principalmente especies terrestres y semi-acuáticas en relación a aquellas de hábitos arbóreos o acuáticos, las cuales poseen menor representación en estos sistemas (Attademo y col., 2005; Peltzer y col., 2005; 2006). De esta manera, se corroboró que las especies de anuros presentan la capacidad de “ajustarse” a estos disturbios de origen antrópico mediante distintas respuestas bioecológicas y bioquímicas (Lajmanovich y col., 2009; 2010).

Otro aspecto asociado con el modelo agrícola actual es la creciente aplicación de agroquímicos (e.g. fertilizantes y plaguicidas) para aumentar el rendimiento de los cultivos. El cultivo de soja es el principal responsable del crecimiento de la utilización de agroquímicos en Argentina (Bejarano González y col., 2008; CASAFE, 2010). Este cultivo demanda alrededor del 46% del total de plaguicidas utilizados por los agricultores, seguida por el maíz con el 10%, el girasol con otro 10% y el algodón con alrededor del 7%. En la última temporada (2009-2010), se utilizaron más de 200 millones de litros de plaguicidas, de los cuales 170 millones correspondieron sólo a formulaciones del herbicida glifosato, seguido por los insecticidas como el endosulfán y la cipermetrina, entre muchos otros (CASAFE, 2010). Al respecto, son numerosas las investigaciones a nivel mundial que documentaron los diversos impactos negativos de los agroquímicos sobre el desarrollo normal de los anfibios anuros (McCoy y col., 2008; Rohr y col., 2008; Widder y Bidwell; 2008; Mann y col., 2009; Belden y col., 2010; Ezemonye y Tongo, 2010; Hayes y col., 2010; Webber y col., 2010; Relyea, 2012, entre muchos otros). Dentro de la Argentina, específicamente en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, existen numerosos antecedentes que reflejan el interés por evaluar la exposición a plaguicidas de uso masivo y sus efectos sobre los anfibios. Por ejemplo, se demostró que la cipermetrina

produce la inducción en el desarrollo de procesos apoptóticos de las células nerviosas de larvas de *Physalaemus biligonigerus* y *Rhinella arenarum* (Izaguirre y col., 2000; Casco y col., 2006). De igual forma, se comprobó la acción del herbicida glifosato en la producción de modificaciones morfológicas, etológicas y respiratorias en larvas de *Scinax nasicus* (Lajmanovich y col., 2003), y el poder genotóxico de los insecticidas endosulfán, en larvas de *Hypsiboas pulchellus* (Lajmanovich y col., 2005a), y cipermetrina, en larvas de *Odontophrynus americanus* (Cabagna y col., 2006). Por otra parte, en áreas predominantemente agrícolas de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos se detectó en anfibios anuros la presencia de residuos de plaguicidas clorados (Lajmanovich y col., 2002; 2005b), así como también, numerosos casos de anfibios con malformaciones (Peltzer y col., 2001; Attademo y col., 2004; Peltzer y col., 2011). Por su parte, en anuros frecuentes de agroecosistemas de la región centro-este de la provincia de Entre Ríos se observó disgenesia testicular (Sanchez y col., 2009).

En la zona de estudio, se siembra soja desde mediados de octubre a fines de noviembre, como siembra temprana (soja de primera), al igual que el maíz y el girasol, o bien de fines de noviembre a mediados de enero, si es precedida por un cultivo de invierno, como trigo, cebada o centeno (soja de segunda) (Lanteri, 2009). Por lo tanto, el principal período de aplicación de agroquímicos se produce entre los meses de noviembre y marzo (Lorenzatti y col., 2004), en coincidencia con el ciclo reproductivo estacional (primavera-verano) de los anfibios. En ese lapso de tiempo, las lluvias cortas e intensas arrastran por escorrentía a los plaguicidas, alcanzando cuerpos de agua superficiales (Hang y col., 2010). En este sentido, Jergentz y col. (2005) observaron en algunas regiones intensamente cultivadas de Argentina que los insecticidas más ampliamente usados (clorpirifos, cipermetrina y endosulfán) eran detectados en sedimentos, partículas en suspensión, y agua en concentraciones que exceden los niveles permitidos para la protección de la vida silvestre. También, Peltzer y col. (2008) registraron en cuerpos de agua agrícolas concentraciones de residuos de endosulfán que sobrepasaron los valores sugeridos para conservar la fauna acuática en los cuerpos de agua (NGNCA, 2004a).

### **1.3. Los anfibios, los agroquímicos y la depredación**

En los últimos años, se ha puesto en evidencia que la presencia en el ambiente de estresores antropogénicos, como los agroquímicos, está relacionada con efectos indirectos en los anfibios que se manifiestan a nivel de comunidad (Relyea y col., 2005; Relyea, 2009). Una explicación posible a este fenómeno podría atribuirse a que la incorporación de sustancias xenobióticas a los ecosistemas no es la suficiente para causar la muerte fisiológica de los

organismos (Davidson, 2004; Fellers y col., 2004), pero si capaz afectar su funcionamiento en un contexto ecológico, denominada muerte ecológica (Scott y Sloman, 2004).

Para comprender el efecto de los agroquímicos en los ambientes acuáticos, la mayoría de las investigaciones realizadas en este sentido, suelen examinar el impacto de una determinada sustancia sobre una especie en particular, excluyendo a otros organismos de la cadena alimentaria. Estos estudios permitieron demostrar que la especie de interés puede ser afectada por los agroquímicos a través de efectos directos sobre la fisiología individual. De esta manera, como efectos subletales en las larvas de anfibios se señalaron la alteración de la actividad natatoria (Bridges, 1997; Raimondo y col., 1998; Hatch y Blaustein, 2000; Fordham y col., 2001; Punzo, 2005), reducción de la tasa de alimentación (Berrill y col., 1993; Widder y Bidwell, 2008), modificación de la relación con su depredador (Cooke, 1971; Jung y Jagoe, 1995; Relyea y Mills, 2001; Broomhall, 2004; Burgett y col., 2007), cambios en el tiempo de metamorfosis (Boone y Bridges, 2003; Greulich y Pflugmacher, 2003; Rohr y col., 2004; Cauble y Wagner, 2005; Teplitsky y col., 2005; Edwards y col., 2006; Forson y Storfer, 2006; Boone, 2008), inhibición en la actividad de enzimas colinesterasas (Venturino y Pechen de D'Angelo, 2005; Lajmanovich y col., 2009; 2011; Junges y col., 2010), alteración de los parámetros hematológicos (Barni y col., 2007; Cabagna-Zenklusen, 2012) y el desarrollo de micronúcleos (Lajmanovich y col., 2005a; Cabagna y col., 2006; Vera Candiotti y col., 2010; Bosch y col., 2011), entre los principales impactos estudiados.

Aunque la especie de interés (larvas de anfibios) puede ser afectada por los agroquímicos directamente a través de efectos sobre la fisiología individual, es importante señalar, que la exposición subletal a agroquímicos actuaría como un factor de estrés adicional a las fuerzas que regulan las poblaciones de anfibios (e.g. la depredación y la competencia), reflejando indirectamente sus consecuencias sobre las interacciones entre especies (Peacor y Werner, 2001). En este sentido, se ha documentado que el estrés causado por la escasa disponibilidad de alimentos o por la fuerte presión de competencia pueden aumentar la letalidad de los agroquímicos para las larvas de anfibios (Postma y col., 1994; Hanazato y Hirokawa, 2004; Beketov y Liess, 2005; Jones y col., 2011). Asimismo, el estrés producido por la depredación sumado a la presencia de un agroquímico modifica los parámetros hematológicos (Shutler y Marcogliese, 2011), disminuye la masa corporal (Relyea, 2012), así como también aumenta la toxicidad (Relyea y Mills, 2001; Relyea, 2003a; 2004; 2005) y la genotoxicidad de los agroquímicos en los anfibios (Giri y col., 2012). Más aún, distintas investigaciones indicaron que concentraciones subletales de agroquímicos pueden alterar la intensidad de las interacciones depredador-presa, afectando de manera diferente a depredador y presa, y consecuentemente,

modificar la composición de la comunidad ecológica (Reeves y col., 2010; Relyea y Edwards, 2010; Relyea, 2012). Así, varios estudios han demostrado que la exposición a insecticidas puede indirectamente beneficiar a los anfibios mediante la eliminación de sus competidores, y así aumentar los recursos alimentarios disponibles para los renacuajos favoreciendo su desarrollo y supervivencia (Boone y Semlitsch, 2001; 2002; Bridges y Boone, 2003; Boone y col., 2004; Rohr y Crumrine, 2005; Boone y Bridges-Britton, 2006); o también, porque influye en la supervivencia de sus depredadores cuando éstos son más sensibles que la presa (Boone y Semlitsch, 2003; Mills y Semlitsch, 2004; Relyea y col., 2005).

Como se puede observar, el estudio de los efectos indirectos de los agroquímicos sobre los anfibios, principalmente en las interacciones depredador-presa, cobraron relevancia en los últimos años. Posiblemente, porque a través de estos estudios se podría lograr un importante acercamiento al conocimiento de los mecanismos biológicos que operan en condiciones naturales. Sin embargo, pese a su importancia ecológica y realismo, los estudios en esta línea de investigación son recientes y escasos.

#### **1.4. Los anfibios como especies bioindicadoras**

Una especie bioindicadora puede definirse como cualquier organismo doméstico o silvestre, animal o vegetal, que puede utilizarse como un indicador del estado de los recursos y la calidad del medio, debido a su sensibilidad, posición en una comunidad, la probabilidad de exposición, su distribución geográfica y ecológica (Lower y Kendall, 1990). De acuerdo a estas características, los anfibios han sido considerados como buenos indicadores de la salud del ecosistema, ya que su ciclo de vida bifásico (agua-tierra), la permeabilidad de su piel, su restringida área de acción (“home range”) y sus limitadas habilidades de dispersión, los hace especialmente vulnerables a las perturbaciones o modificaciones del ambiente (US.EPA, 2002; Jansen y Healey, 2003; Hopkins, 2007; Wake y Vredenburg, 2008; Burlibaşa y Gavrilă, 2011).

Además, los anfibios son capaces de ocupar diversos nichos tróficos, desde planctívoros durante su desarrollo larval hasta carnívoros siendo adultos, cumpliendo un importante rol en la transferencia de energía y nutrientes a través de las redes tróficas acuática y terrestre (Stebbins y Cohen, 1995; Parmelee, 1999; Beard y col., 2002). Por tal motivo, la pérdida o disminución de las poblaciones de anfibios afectaría ampliamente a otros organismos; fenómeno que se está documentando a escala mundial (Wyman, 1990; Blaustein y col., 1994; Blaustein y Wake, 1995; Alford y Richards, 1999; Davidson y col., 2001; Storfer, 2003; Tejedo, 2003; Stuart y col.,

2004; Lips y col., 2005; Blaustein y Bancroft, 2007; Collins y Crump, 2009; Collins, 2010; Blaustein y col., 2011; 2012).

Existe un gran número de investigaciones que demuestran la utilización de los anfibios como indicadores sensibles de cambios en los ecosistemas. Sin embargo, dentro del ciclo de vida de los anfibios, las fases acuáticas son las más utilizadas como modelos experimentales para investigaciones ecotoxicológicas (Kloas, 2002; Herkovits y col., 1996; Mann y col., 2009; Sparling y col., 2010). Características ideales en cuanto a sensibilidad, elevado número y alta homogeneidad de los individuos, como también sus características morfológicas y fisiológicas (McDiarmid y Altig, 1999; Greulich y Pflugmacher, 2003), colaboran para que los estudios utilizando larvas de anfibios se encuentren dentro de los más frecuentes.

## **1.5. Biomarcadores**

Un biomarcador se define como la respuesta bioquímica, fisiológica, morfológica y comportamental originada en los organismos, cuya alteración, es relacionada con la exposición a uno o más contaminantes químicos o físicos (Lagadic y col., 1994; 1997; Van der Oost y col., 2003). Incluyen respuestas en los niveles poblacionales, aunque para detectar de manera precoz los efectos adversos de los contaminantes, se utilizan con mayor frecuencia biomarcadores en niveles bajos de organización biológica, esto es a nivel celular y molecular (Kendall y col., 2005). Existe una amplia variedad de biomarcadores que se utilizan para la evaluación de los anfibios frente a distintas situaciones ambientales durante su vida, y su estimación a lo largo del tiempo puede brindar información valiosa para los programas de monitoreo biológico (US.EPA, 2002; Sánchez-Hernández, 2003; Lajmanovich y col., 2010). Entre los distintos tipos de indicadores biológicos se pueden citar: las respuestas etológicas o comportamentales y las enzimáticas o metabólicas.

### **1.5.1. Biomarcadores etológicos**

El comportamiento es una de las más importantes propiedades de la vida animal y juega un rol crítico en las adaptaciones biológicas, ya que es el nexo entre los organismos y el medio, es decir, entre el sistema nervioso y el ecosistema (Little, 2002; Preisser y col., 2005; Weis y col., 2001; 2011). Por lo tanto, podemos referirnos al comportamiento como un rasgo esencial de los organismos, cuya alteración implica un disturbio que trasciende al individuo (Denöel y col., 2012; 2013). Por ejemplo, está demostrado que la actividad natatoria en las larvas de

anfibios se relaciona positivamente con el tiempo destinado a la alimentación (forrajeo) (Horat y Semlitsch, 1994) y negativamente con la tasa de depredación (Relyea, 2007). En otras palabras, menor actividad natatoria se asocia a menor forrajeo (Semlitsch, 1993; Horat y Semlitsch, 1994; Rist, 1994) ya que el depredador induce a la larva a pasar menos tiempo alimentándose (Relyea 2002; 2003b), y por lo tanto, menor tasa de depredación (Van Buskirk y col., 1997; Van Buskirk y Relyea, 1998). Sin embargo, este cambio de comportamiento tiene fuertes efectos negativos asociados a un menor crecimiento y desarrollo (Skelly, 1992; Van Buskirk, 2000), como por ejemplo: menor tamaño al alcanzar la metamorfosis implica reducida sobrevivencia postmetamorfosis, mayor tiempo para alcanzar la madurez reproductiva, reducción del tamaño en la madurez, menos apareamientos exitosos y puestas de huevos de pequeño tamaño (Berven y Gill, 1983; Smith, 1987; Semlitsch y col., 1988; Altwegg y Reyer, 2003; Semlitsch y col., 2005b).

La ecotoxicología del comportamiento es una disciplina emergente que permite cuantificar las respuestas etológicas de los organismos ante determinadas situaciones de estrés físico, químico o biológico (Rinderhagen y col., 2000; Broomhall, 2005; Denoël y col., 2010). Al tener en cuenta que este tipo de respuestas antecede a la mortalidad, las alteraciones etológicas son consideradas medidas más sensibles a los xenobióticos que la muerte de los organismos (Little y col., 1990), y por lo tanto, se recomienda su empleo en complemento con otros marcadores estándares de toxicidad (Scott y Sloman, 2004). A su vez, aunque las respuestas etológicas sean restringidas al nivel de los individuos son consideradas como una herramienta de relevancia ecológica, ya que permite relacionar una variedad de desórdenes fisiológicos con procesos ecológicos a través de cambios en el comportamiento individual de los organismos (Amiard-Triquet, 2009; Tu y col., 2010). Al considerar estas características, los cambios en el comportamiento son señalados como biomarcadores de respuesta temprana, rápida, muy sensible y no destructiva (Ferrando y Andreu-Moliner, 1993; Cohn y MacPhail, 1996; Wolf y col., 1998; Scott y Sloman, 2004; Hellou, 2011), ideales para el monitoreo de poblaciones expuestas a contaminantes ambientales (Atchison y col., 1987; Sánchez-Hernández, 2011).

Si bien el uso de biomarcadores etológicos desde el punto de vista de la ecotoxicología no está tan desarrollado en los anfibios, las investigaciones realizadas hasta el momento han discutido las consecuencias directas sobre el comportamiento de los anfibios en respuesta a la exposición a los agroquímicos (Semlitsch y col., 1995a; Bridges, 1997; Raimondo y col., 1998). En este sentido, se destaca el trabajo realizado por Salibián (1992), quien describió a través del comportamiento diferentes fases (I-IV) de la neurotoxicidad del insecticida piretroide

deltametrina en larvas de *Rhinella arenarum*, conforme aumenta la concentración. Recientemente, Denoël y col. (2012) postularon que concentraciones subletales del plaguicida organoclorado endosulfán modificaron funciones esenciales de las larvas de *Rana temporaria* como la locomoción, la respiración y la alimentación. Concretamente, observaron que las larvas de anfibios expuestas respiraban, se alimentaban y movían menos que las no expuestas, y que además de presentar comportamientos erráticos (movimiento rápido de natación circular y postura lateral anormal), ocupaban la parte central de los acuarios, sin hacer uso del espacio periférico. No obstante, las alteraciones etológicas producidas por la exposición a agroquímicos también pueden causar consecuencias indirectas sobre otros niveles de mayor complejidad (Eissa y col., 2003), como por ejemplo la alteración de comportamientos asociados con la depredación. En este sentido, Cooke (1971) determinó que el DDT produjo hiperactividad en los renacuajos, y en consecuencia, presentaron mayor riesgo de depredación que los renacuajos no expuestos; mientras que por el contrario, Bridges (1997) halló que el insecticida carbaril redujo la actividad de los renacuajos expuestos y por lo tanto, fueron menos depredadas que las larvas expuestas (Bridges, 1999). También se detectó que las larvas de anfibios presentaron mayor vulnerabilidad a la depredación cuando se encontraban expuestas al insecticida metoxicloro, debido a modificaciones en sus mecanismos defensivos (Ingermann y col., 2002). Sin embargo, estos aspectos más complejos del comportamiento, ambientalmente más relevantes, siguen siendo muy poco explorados. En consecuencia, es que surge la necesidad de evaluar desde la ecotoxicología el impacto de los agroquímicos mediante el empleo de herramientas útiles y de relevancia ecológica capaces de proveer un sistema de alerta temprano, antes de que puedan ser detectadas respuestas a nivel de comunidad.

### **1.5.2. Biomarcadores enzimáticos**

Los biomarcadores enzimáticos, o metabólicos, son aquellos que involucran cambios en la actividad de diferentes enzimas relacionadas con la capacidad de hidrolizar y detoxificar contaminantes químicos (Mohammad, 2007). Las enzimas son de gran valor diagnóstico debido más a la rapidez con la que se ven alteradas que por la especificidad del tejido de origen (Vasseur y Cossu-Leguille, 2003), brindando de esta manera, información valiosa para poder predecir efectos adversos ante la exposición a diferentes compuestos químicos (McCarthy y Shugart, 1990; Fossi y Leoncio, 1994; Lagadic y col., 1994).

Las esterasas son un grupo de enzimas que hidrolizan ésteres fosfóricos, carboxílicos, de fosfato y amidas. Aldridge (1953) clasificó a las esterasas en función de su interacción con los

compuestos organofosforados (OFs). Así, las A-esterasas son capaces de hidrolizar OFs, las B-esterasas son inhibidas por ellos, y las C-esterasas no ejercen ninguna interacción con estas sustancias químicas. Esta clasificación sigue siendo la más usada por la mayor parte de los investigadores. Dentro de las enzimas pertenecientes al grupo de las B-esterasas encontramos a las colinesterasas (ChEs) y carboxilesterasas (CbEs). Por su parte, las ChEs pueden definirse como un grupo de esterasas de serina capaces de hidrolizar ésteres de colina, tales como la acetilcolina. Las ChEs de los vertebrados se clasifican dependiendo de sus características bioquímicas y fisiológicas en dos grupos principales, que son codificadas por dos genes distintos: la colinesterasa verdadera o acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) y la pseudocolinesterasa o butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8).

Desde su descubrimiento en la década de 1920, la AChE ha sido una de las enzimas más estudiadas en cuanto a su efecto fisiológico, mecanismo de acción, naturaleza de su centro activo, así como su distribución y localización en diferentes tejidos (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008). La AChE se encuentra presente en músculo, sangre, plasma, linfocitos y eritrocitos de los vertebrados (Szelenyi y col., 1982; Brimijoin, 1983; Sturm y col., 1999). En el sistema nervioso, la AChE desempeña un importante papel en la neurotransmisión, ya que hidroliza rápidamente a la acetilcolina en acetato y colina, regulando la concentración de este neurotransmisor en la sinapsis.

Por su parte, la BChE es sintetizada en el hígado y está presente en el plasma y en otros tejidos como músculo, mucosa intestinal y sistema nervioso central de los vertebrados (Lockridge y col., 1987; Walker y Thompson, 1991). A pesar de su amplia distribución en los principales tejidos de los animales, su función biológica no ha sido determinada con claridad. Quizás una de las ideas más extendidas formulada por diversos autores sea la posibilidad de que la BChE actúe como protectora de la AChE, sustituyendo a la AChE cuando ésta se encuentra inhibida o ausente (Li y col., 2000; Stefanidou y col., 2009). Esta posibilidad parece consolidarse ya que se ha demostrado que la BChE tiene un efecto protector frente a la intoxicación por OFs, al administrarse como tratamiento profiláctico en ratas, cobayas y primates (Raveh y col., 1997; Allon y col., 1998; Mehrani, 2004).

Las enzimas con actividad colinesterasa pueden ser inhibidas por ciertos agentes químicos como los insecticidas OFs, carbamatos (CBs) y piretroides (Wheelock y col., 2004; 2008; Sánchez-Hernández, 2006; 2007; Widder y Bidwell, 2008), característica que ha permitido su utilización como biomarcador (Monserrat y col., 2007). En recientes estudios, se han reportado que otras clases de compuestos, tales como metales (Diamantino y col., 2003; Frasco y col., 2006; Jebali y col., 2006; Costa y col., 2007), detergentes (Guilhermino y col.,



1998; 2000; Jifa y col., 2005; Nunes y col., 2005), hidrocarburos (Kang y Fang, 1997; Oropesa y col., 2007), productos farmacéuticos (Nunes y col., 2006) y formulaciones del herbicida glifosato (Gluszczak y col., 2006; Lajmanovich y col., 2010; Ruamthum y col., 2011; Menéndez-Helman y col., 2012) podrían actuar como agentes anti colinesterásicos. Por tal motivo, una reducción en el nivel de actividad de las colinesterasas en tejidos de origen animal es un signo fuertemente indicativo de que se ha producido algún tipo de exposición a un agente inhibidor de estas enzimas.

En los últimos años, se han incrementado las evidencias del empleo de técnicas bioquímicas que permitan determinar el nivel de inhibición en las enzimas implicadas en la detoxificación de agroquímicos, y de cómo estos biomarcadores ayudan a comprender los efectos adversos de los agroquímicos sobre los anfibios (Venturino y col., 2003; Venturino y Pechen de D'Angelo, 2005). Por ejemplo, Lajmanovich y col. (2004) hallaron niveles plasmáticos disminuidos de colinesterasa en individuos de *Rhinella schneideri* debido al impacto de los agroquímicos en la zona de muestreo, la cual se encontraba intensamente cultivada con maíz y soja. Por su parte, Widder y Bidwell (2006) estudiaron cómo la exposición al insecticida organofosforado clorpirifos inhibió la actividad de las ChEs en renacuajos de *Rana sphenoccephala* luego de 12 días de exposición a 100 y 200 µg/l. También observaron una inhibición de las ChEs dosis-dependiente en cuatro especies diferentes de renacuajos expuestos a concentraciones subletales de clorpirifos (Widder y Bidwell, 2008). Asimismo, en ejemplares de *Rhinella schneideri* y *Leptodactylus chaquensis* provenientes de campos de arroz, se observó una disminución en la actividad de las enzimas BChE y CbEs (Attademo y col., 2007; 2011), sugiriendo el empleo de enzimas pertenecientes al grupo de las B-esterasas como biomarcadores útiles para conocer a campo los efectos de la exposición a agroquímicos sobre los anfibios anuros. De la misma manera, Lajmanovich y col. (2010) demostraron inhibición en la actividad de las enzimas B-esterasas (AChE, BChE y CbEs) en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a distintas formulaciones comerciales de glifosato; herbicida que según la Organización Mundial de la Salud y la FAO (WHO/FAO, 1996) no inhibe las ChEs. También, Ferrari y col. (2011) observaron inhibición de las ChEs en renacuajos de *Rhinella arenarum* luego de 48 h de exposición a metil anzifos (organofosforado) y carbaril (carbamato). Recientemente, Leite y col. (2010) evaluaron el efecto del insecticida organofosforado diazinon sobre la actividad de las B-esterasas en larvas de *Scinax fuscovarius*, concluyendo que la AChE resultó ser el biomarcador más sensible frente a la exposición al diazinon.

Al considerar lo expuesto anteriormente, se generan numerosas evidencias de que los agroquímicos son capaces de ejercer sus efectos tóxicos mediante procesos indirectos que generan interrupciones en las interacciones bióticas; y que los anfibios como organismos bioindicadores, a través de los biomarcadores etológicos y enzimáticos, proporcionan información relativa a los efectos de estos compuestos a niveles de contaminación muy bajos, pero significativos para el ecosistema, ya que por ser rápidamente degradados en el ambiente y metabolizados en los tejidos animales, no permiten su detección directa.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 2.1. Hipótesis

**H<sub>1</sub>:** Concentraciones subletales de plaguicidas alteran las interacciones depredador-presa entre larvas de anfibios (presas) y juveniles de *Synbranchus marmoratus* (depredador) del litoral mesopotámico argentino.

**H<sub>2</sub>:** Concentraciones subletales de plaguicidas alteran las respuestas etológicas y metabólicas de las presas, interfiriendo en las interacciones depredador-presa.

**H<sub>3</sub>:** Concentraciones subletales de plaguicidas alteran las respuestas metabólicas del depredador, interfiriendo en las interacciones depredador-presa.

### 2.2. Objetivos

#### 2.2.1. Objetivo general

- Analizar experimentalmente las interacciones depredador-presa entre distintas especies de larvas de anfibios y un pez depredador (*Synbranchus marmoratus*) del litoral mesopotámico argentino, y establecer su relación con las variaciones en las respuestas etológicas y metabólicas, en presencia de concentraciones subletales de tres plaguicidas: fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS).

#### 2.2.2. Objetivos específicos

- Estimar la tasa de depredación de *S. marmoratus* sobre distintas especies de larvas de anfibios utilizando diferentes tratamientos que combinan la exposición o no de depredador y presa a los plaguicidas F, Gly y TFS.
- Determinar en larvas de anuros expuestas y no expuestas a concentraciones subletales de los plaguicidas F, Gly y TFS, respuestas etológicas relacionadas con la actividad natatoria.
- Evaluar en depredadores y presas expuestos y no expuestos a los plaguicidas F, Gly y TFS, la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (respuestas metabólicas).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

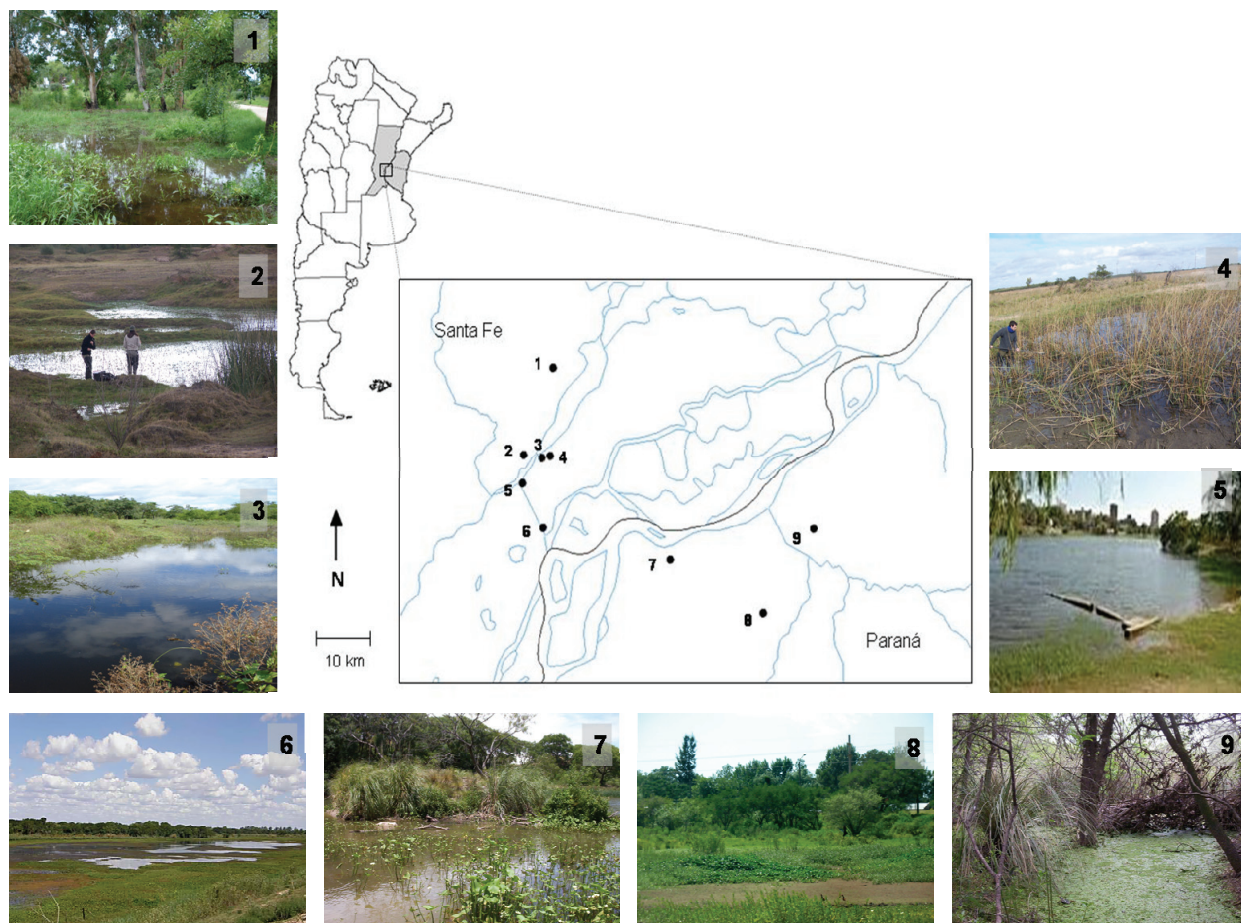
#### 3.1. Área de estudio y sitios de muestreo

El río Paraná es, por su longitud, el segundo río de Sudamérica después del Amazonas, y se divide en tres tramos: Superior, Medio e Inferior. Particularmente, el Paraná Medio posee un extenso valle de inundación que sostiene una gran diversidad de ambientes, limitados entre el curso principal y los valles secundarios. La característica más saliente de este ecosistema son las variaciones del nivel hidrométrico que generalmente se corresponden con los meses de mayor temperatura. El ciclo hidrológico del río (Drago, 1989; Neiff, 1999) registra un período de ascenso en verano y otoño, causadas por las precipitaciones en las regiones tropicales y subtropicales de su alta cuenca. Luego comienza a descender alcanzando los menores caudales durante el invierno. Además de las crecientes anuales, el río Paraná está sujeto a crecientes extraordinarias, transcurriendo un período de inundación de mayor duración. Durante estos procesos hidrológicos, los cuerpos de agua leníticos se conectan con los pequeños y medianos cauces secundarios del río, salvo en crecientes importantes, donde todo el valle queda cubierto por agua (Soldano, 1947; Oldani, 1990; Neiff y Giraudó, 2006). Al manifestarse estos fenómenos, se tipifica un área que puede ser considerada como el más importante nexo y colector de la red fluvial que aporta grandes volúmenes de nutrientes, sedimentos y sales desde el continente al océano Atlántico Sur (Iriondo y col., 2007). El pulso de inundación, actúa también como un factor regulador de la distribución y abundancia de las especies de anfibios y peces que habitan la llanura de inundación (Bonetto y col., 1969; Junk y col., 1989; Tockner y col., 2000).

Los sitios de muestreos para la obtención de depredadores y presas se encuentran ubicados dentro la región centro-este de la provincia de Santa Fe y centro-oeste de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Estas son áreas de transición de las eco-regiones del Espinal y Delta-Islas del río Paraná (Burkart y col., 1999), con precipitaciones distribuidas durante la primavera-verano y temperaturas anuales promedio de 18 °C. En ambas se encuentran representados elementos florísticos de transición de las eco-regiones Deltas e Islas del Río Paraná y el Espinal (Burkart y col., 1999). Zoogeográficamente, se encuentran incluidas en Dominio Subtropical (Subregión Guayano-Brasileña) representado por el Distrito Mesopotámico con una menor influencia del Distrito Pampásico (Ringuelet, 1961). Gran parte de esta región se localiza en tierras de alto desarrollo agrícola y urbano, motivo por el cual su superficie se ha visto fuertemente reducida en las últimas décadas (Morello y Mateucci, 1999; Brown y col., 2006; Morello y Rodríguez, 2007). El área restante está representada por remanentes de vegetación nativa que varían en su grado de conectividad y antropización. Actualmente, sólo pueden encontrarse fragmentos de dichos bosques asociados a las barrancas del río Paraná Medio en sitios menos afectados por la expansión urbana y agropecuaria debido a su carácter de zonas inundables y de poca importancia económica (Peltzer y col., 2006).

Para la recolección de depredadores y presas, se seleccionaron áreas cuerpos de agua localizados en el valle de inundación del río Paraná Medio, con gran cantidad de especies vegetales nativas y que no estén influenciados directamente con actividades agroindustriales. Las características anteriormente descriptas permitieron seleccionar los siguientes lugares de muestreo, que pueden observarse en la Figura 1:

1. Laguna origen pluvial (31° 33'23,4''S - 60° 39'46,8''O), La Guardia, Santa Fe.
2. Zona aldeaña al puerto (31° 38'49,43''S - 60° 41'42,14''O), Santa Fe, Santa Fe.
3. Reserva Ecológica de la Universidad Nacional del Litoral (31°38'26''S - 60°40'22''O), Santa Fe, Santa Fe.
4. Laguna aldeaña a ruta nacional N° 168 (31° 38'19,14''S - 60° 39'47,1''O), Colastiné, Santa Fe.
5. Parque del Sur (31° 39'51,7''S - 60° 42'47,9''O), Santa Fe, Santa Fe.
6. Isla Sirgadero (31° 42'17,2'' S - 60° 40'2,0'' O), Alto Verde, Santa Fe.
7. Parque Urquiza (31° 43'59''S - 60° 31'7,3''O), Paraná, Entre Ríos.
8. Laguna Almafuerte (31° 46'17,9''S - 60° 24'9,5''O), Paraná, Entre Ríos.
9. Reserva Natural de Uso Múltiple Parque General San Martín (31° 40'29''S - 60° 20'13''O), Paraná, Entre Ríos.



**Figura 1:** Área de estudio y sitios de muestreo. En el mapa y en las fotos: 1) Laguna La Guardia; 2) Zona aledaña al puerto de Santa Fe; 3) Reserva ecológica UNL; 4) Zona aledaña RN N°168; 5) Parque del Sur; 6) Isla Sirgadero; 7) Parque Urquiza; 8) Laguna Almafuerte; 9) Reserva Natural de Uso Múltiple Parque Gral. San Martín.

El período completo de muestreo durante el cual se llevaron a cabo las actividades de campo fue de 4 años (desde 2007 a 2011). Se realizaron inspecciones diurnas de distintos ambientes acuáticos, con una frecuencia semanal, y con salidas a campo adicionales durante la temporada reproductiva de los anfibios (primavera-verano), y en aquellas semanas con lluvias intensas. El verano 2008-2009 presentó altas temperaturas y escasez de lluvias, lo cual produjo una notable disminución en la reproducción de los anfibios por no formarse cuerpos de agua, y también una reducción en la disponibilidad de depredadores.

### 3.2. Selección y descripción de las especies

Para la realización de las experiencias se seleccionó a *Synbranchus marmoratus* como especie característica de la ictiofuna nativa local y potencial organismo depredador de larvas de anfibios. La misma respondió exitosamente a las condiciones controladas de laboratorio, y además, se mantuvo presente en los ambientes muestreados durante el período necesario para

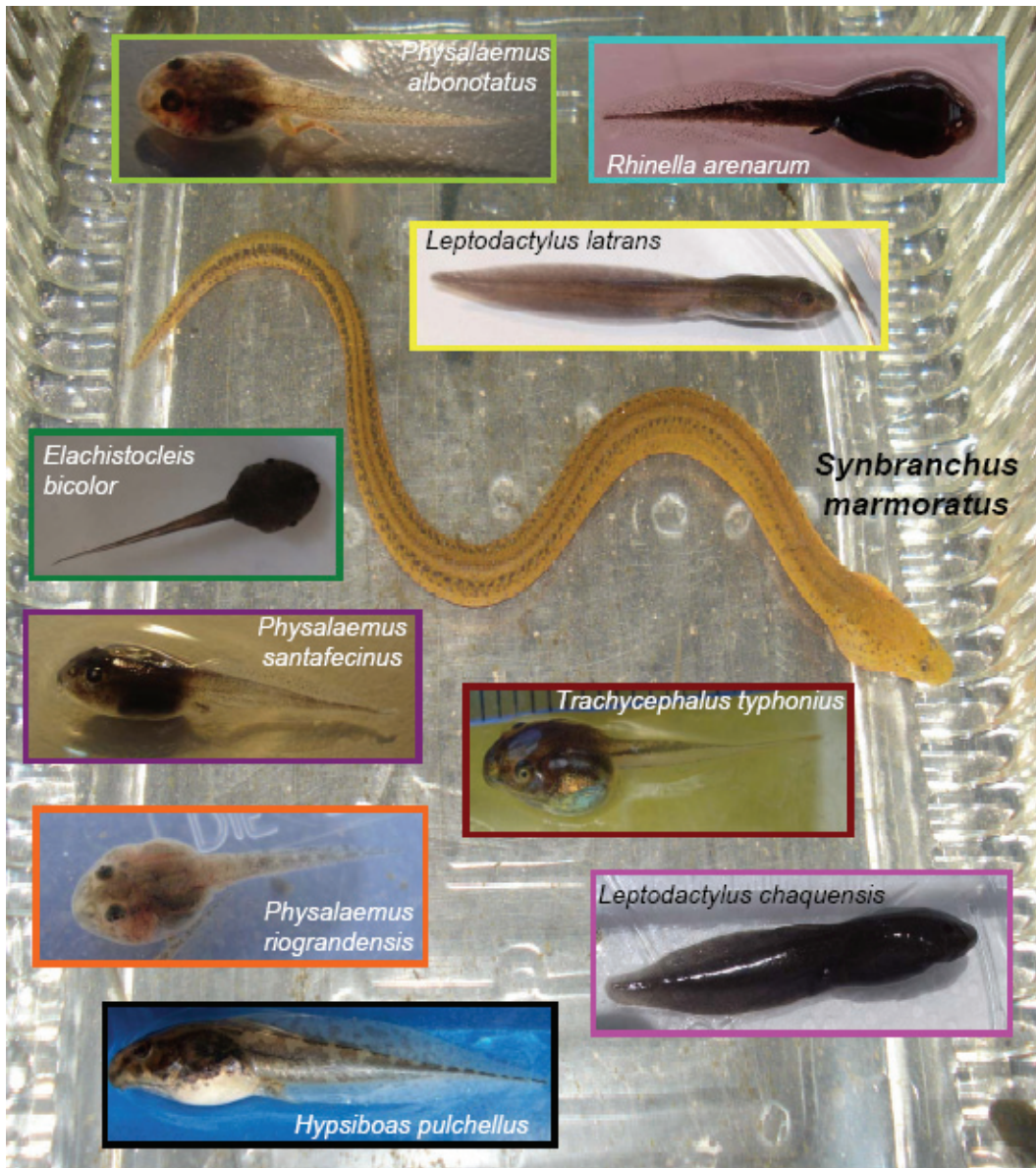
realizar los ensayos. Asimismo, esta decisión también se sustenta con los resultados obtenidos de los diferentes muestreos exploratorios, realizados previamente al comienzo de esta tesis, que corroboran los hallazgos de Maffei y col. (2011), quienes postulaban las posibles interacciones entre *S. marmoratus* y las larvas de anfibios.

Las presas seleccionadas fueron nueve especies de larvas de anfibios que potencialmente coexisten con *S. marmoratus*, pertenecientes a cinco familias (Frost, 2011): *Rhinella arenarum* (Bufonidae), *Leptodactylus latrans*, *L. chaquensis* (Leptodactylidae), *Physalaemus santafecinus*, *P. albonotatus*, *P. riograndensis* (Leiuperidae), *Trachycephalus typhoni*, *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) y *Elachistocleis bicolor* (Microhylidae). Ninguna de ellas se encuentra catalogada como amenazada según los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2010; Vaira y col., 2012) y todas presentan un amplio rango de distribución y abundancia en la región neotropical. Estas especies se encuentran con frecuencia en bosques, humedales, tierras agrícolas y áreas urbanas (Attademo y col., 2005; Peltzer y col., 2006; Peltzer y Lajmanovich, 2007; Duré y col., 2008; Lajmanovich y col., 2010). Sin embargo, su reproducción suele llevarse a cabo en lagunas agrícolas temporales producidas por las lluvias estacionales, donde toman contacto con los agroquímicos utilizados en los principales cultivos extensivos del área (soja, maíz y sorgo).

La determinación taxonómica de *S. marmoratus* fue realizada mediante claves de identificación disponibles para los peces de la cuenca del río Paraná (Ringuelet y col., 1967; Britski y col., 1999; López y col., 2003). Mientras que para las larvas de anfibios, la determinación taxonómica y nomenclatural se llevó a cabo mediante el uso de claves específicas para anfibios (Cei, 1980; 1987; Kehr y Williams, 1990; Lavilla y Cei, 2001; Frost y col., 2006; Lavilla y col., 2010; Pyron y Wiens, 2011), o mediante la comparación con el material de referencia preservado en la Colección Herpetológica del Laboratorio de Ecotoxicología de la FBCB-UNL.

A continuación se describen las principales características de las especies seleccionadas para este trabajo de tesis, las cuales pueden observarse en la Figura 2:





**Figura 2:** Especies seleccionadas para el desarrollo de la presente tesis.

### 3.2.1. Depredador

*Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795) (Teleostei: Synbranchidae), es un pez nativo vulgarmente conocido como anguila criolla (Kullander, 2003). De cuerpo desnudo, anguiliforme, que se afina progresivamente hacia la región caudal (Lüling, 1980). La forma de la cabeza es subcónica, con el extremo anterior agudo, y la boca es terminal, amplia y los ojos pequeños; carece de aletas pectorales y pélvicas; presenta aletas caudal, dorsal y anal confluentes y reducidas a un repliegue cutáneo que se observa, incluso, en tempranos estadios de vida (Taylor, 1913; Rodríguez, 1999). Su coloración es gris ceniza con motas en el dorso, y

castaño claro en el flanco y vientre, salpicados de diminutas manchas negras. La estrategia reproductiva de *S. marmoratus* es de tipo hermafrodita protogínico diándrico. Es decir, existen hembras y machos primarios con ovarios y testículos respectivamente; hay machos secundarios que se originan por reversión sexual de hembras, y por último hay intersexos que se dan en el proceso durante el cual el tejido del ovario es reemplazado por tejido testicular (Lo Nostro y Guerrero, 1996). Esta particularidad reproductiva facilita la perpetuación de la especie cuando se producen condiciones de aislamiento por extrema sequía, teniendo más chances de reproducirse que aquellos individuos sin capacidad de reversión sexual (Liem, 1968). Es una especie de hábitos nocturnos, se oculta en el día entre el substrato y/o cobertura vegetal, se pueden desplazar distancias cortas fuera del agua. *S. marmoratus* tiene la capacidad de respirar tanto el oxígeno disuelto en el agua como el atmosférico, función que realiza a través de branquias reunidas en una abertura branquial única (ubicada en la región ventral de la cabeza) y del epitelio de las cavidades bucal y faríngea, ricamente vascularizadas (Rosa, 1977; Graham y Baird, 1984). Esta propiedad le permite desarrollar una amplia distribución en América Neotropical, extendiéndose desde Cuba y México por toda América Latina hasta el sur de la provincia de Buenos Aires en la Argentina (Casciotta y col., 1999), prefiriendo los ríos pocos profundos, de aguas tranquilas, arroyos, bañados, lagunas y esteros donde vive en cuevas que ella misma construye (Maggese y col., 1993). Su estado de conservación no ha sido evaluado (IUCN, 2010).

### 3.2.2. Presas

***Rhinella arenarum* (Hensel, 1867).** Larvas de coloración negruzca, con ojos ubicados dorsalmente y aleta caudal medianamente desarrollada que no se extiende sobre el dorso. El extremo de la cola es redondeado. Generalmente se ubican en el fondo de los cuerpos de agua temporales (bentónicas) (Vera Candioti, 2007), donde ramonean activamente, alimentándose del detrito (Lajmanovich, 1997). Suelen formar agregados larvales (alelomimetismo) (Schmajuk y Segura 1982; Kehr, 1994a; 1994b) que se van disgregando lentamente a medida que se desplazan por las márgenes del cuerpo de agua realizando circuitos alimentarios. Fórmula bucal: 1, 1-1/3.

***Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815).** Larvas de color castaño-oliváceo oscuro, con aletas transparentes y pigmentadas. Cuerpo ovoide, de natación más activa, que se ve reflejado en un mayor desarrollo de sus aletas caudales y en su forma hidrodinámica. Ojos y narinas pequeñas, redondeadas (Rossa-Feres y Nomura, 2006). Hábitos bentónico-nectónico. Las larvas



son fitófagas y detritívoras (Lajmanovich, 1994), con demostrados casos de canibalismo (Vaz Ferreira y col., 1995). Se desarrollan tanto en ambientes permanentes como temporarios (Peltzer y Lajmanovich, 2004), así como también en ambientes playos de reciente inundación. Se caracterizan por presentar comportamiento gregario alelomimético (Vaz Ferreira y Gerhau, 1975; 1986), con agregados numerosos y compactos. Fórmula bucal: 2/3.

***Leptodactylus chaquensis* (Cei, 1950).** Especie simpátrica con *L. latrans*, que a diferencia de ésta tiene la cola más corta y no presenta comportamiento gregario. Hábitos bentónico-nectónico. Larvas de color castaño oscuro y natación activa, con hocico redondeado. Fórmula bucal: 2/3.

***Physalaemus albonotatus* (Steindachner, 1864).** Larvas de color marrón claro, con manchas oscuras dispersas y zona intestinal de color metálico (plata brillante). Cuerpo ovoide, más ancho que alto. Hocico redondeado en vistas lateral y dorsal. Las narinas más cercanas a los ojos que al hocico. Cola con la punta redondeada que abarca más de la mitad del largo del cuerpo (Kehr y col., 2004). Hábitos bentónicos. Fórmula bucal: 1, 1-1/1-1, 2.

***Physalaemus santafecinus* (Barrio, 1965).** Larvas de coloración castaño claro, que no forman agregados y que suelen encontrarse aisladas, y en baja densidad en ambientes temporarios y permanentes (Schaefer, 2007). Hábitos bentónicos (Vera Candiotti, 2007). Fórmula bucal: 1, 1-1/2 (Perotti y Céspedes, 1999).

***Physalaemus riograndensis* (Milstead, 1960).** Larva de colón castaño, que no forman agregados y que suelen encontrarse aisladas, y en baja densidad en ambientes temporarios, permanentes y semipermanentes. Hábitos bentónicos. Fórmula bucal 1, 1-1/1-1, 1 (Sandoval, 2002).

***Trachycephalus typhonius* (Linnaeus, 1758).** Larvas de color marrón, transparentes, con aletas ligeramente pigmentadas. Cuerpo globular, ovalado en vista dorsal triangular y deprimida en vista lateral. Hocico redondeado en vista dorsal e inclinado en vista lateral. Narinas pequeñas y ovaladas ubicadas dorsolateralmente. Ojos laterales pequeños (Rossa-Feres y Nomura, 2006). Hábitos bentónicos-nectónicos. Fórmula bucal: 1, 1-1/1-1,3 o 1, 1-1/ 1-1, 4.

***Hypsiboas pulchellus* (Duméril y Bibron, 1941).** Larvas de color castaño con reflejos dorados, con aleta caudal muy desarrollada (muy nadadoras), con grandes manchas y de punta aguda. Ojos laterales con dos manchas blancas por detrás. Vientre oscuro en la parte anterior y color nacarado en la parte posterior. Larvas de desarrollo relativamente lento, ubicadas generalmente en las márgenes de cuerpos de agua permanente debajo de la cubierta vegetal (Kehr, 1992). Hábitos nectónicos-bentónicos. Fórmula bucal más frecuente 1,1-1/1-1,2.

***Elachistocleis bicolor* (Guérin-Méneville, 1838).** Larvas de color marrón oscuro en el dorso, ventralmente mas claras, con pequeñas manchas adyacentes. Cuerpo globular, cabeza poco aplanada dorsoventralmente, hocico redondeado, narinas dorsales muy cercanas entre si, ojos pequeños y laterales. Cola musculosa teminada en punta, aletas punteadas irregularmente de color castaño (Williams y Gudynas, 1987). Generalmente se las encuentra en el fondo de cuerpos de agua temporales (hábitos bentónicos) con abundante fitoplancton, donde realizan pocos movimientos (Echeverria y col., 2007; Vera Candiotti, 2007). No registran comportamientos gregarios y suelen encontrarse aisladas, en algunos casos junto a ramas de plantas semi-sumergidas. Queratodontes y rostrodontes ausentes (Williams y Gudynas, 1987).

### **3.3. Recolección y acondicionamiento de depredadores y presas**

Para la recolección de depredadores y presas se utilizó la técnica de muestreo con red y se implementó un diseño de caminata al azar (Heyer y col., 1994), lo cual implica que el recorrido que une dos puntos de muestreo consecutivos es aleatorio.

Los ejemplares de *S. marmoratus* y las larvas de anfibios se obtuvieron utilizando una red con marco metálico en forma de D (copo), con mango de 1,5 m de longitud y una abertura de malla, la cual fue arrastrada por las márgenes de las lagunas bajo la macrófita litoral, representada principalmente por *Pistia stratiotes* y *Salvinia herzogii*. Los depredadores y presas recolectados fueron trasportados inmediatamente al laboratorio y conservados *in vivo*, paralelamente bajo condiciones de mesocosmos en tanques de 300 litros de capacidad (Figura 3) ubicados en el Módulo Experimental que posee la Cátedra de Ecotoxicología de la FBCB-UNL, y en peceras de vidrio (37 cm de longitud, 20 cm de ancho y 25 cm de alto) (Figura 3) con 10 L de agua declorinada bajo condiciones estándares de laboratorio (agua declorinada a  $23 \pm 2^\circ$  C, pH = 7, fotoperíodo 12/12 horas luz/oscuridad). Cabe aclarar que los depredadores se colocaron en recipientes separados de las larvas de anfibios, las que fueron agrupadas por especie y colocadas en un mismo recipiente.



**Figura 3:** Mantenimiento de los organismos hasta su empleo en ensayos de depredación y evaluación de respuestas, A y B: bajo condiciones de mesocosmos en tanques de plástico; C y D: bajo condiciones controladas de laboratorio en peceras de vidrio.

Durante su mantenimiento, las anguilas fueron alimentadas con larvas de anfibios de distintas especies, no utilizados para los ensayos, hasta alcanzar estadios juveniles, definidos oportunamente por Taylor (1913) y Rosen y Greenwood (1976). Dichos autores consideran como tamaños límite 26 mm de mínimo y 190 mm de máximo, respectivamente para esta etapa de vida. Para ello, las anguilas fueron medidas en su longitud hocico-cloaca (LHC) y longitud total (LT) con calibre milimétrico digital STRONGER® (0,001 mm de precisión) y determinada su masa corporal (MC) con una balanza OHAUS® CS 200 (0,01 g de precisión). Posteriormente, los individuos fueron acondicionados nuevamente en peceras de 10 L con agua declorinada, pero sin suministro de alimento durante 24 h previas al inicio de los ensayos, para su posterior empleo en ensayos de depredación, como en la evaluación de respuestas etológicas y metabólicas

Por su parte, los renacuajos fueron alimentados *ad libitum* con lechuga hervida hasta alcanzar la prometamorfosis (estadios 36-41, Gosner, 1960), momento en el que fueron

seleccionados al azar, medidos en su longitud hocico-base del tubo proctodeal (H-TP) y Longitud total (LT) con un calibre milimétrico digital STRONGER<sup>®</sup> (0,001 mm de precisión) y determinada su masa corporal (MC) con una balanza Precisa<sup>®</sup> 180A (0,0001 g de precisión), para luego comenzar con las distintas experiencias. Para establecer los estadios de desarrollo (ED), las larvas se colocaron bajo lupa trinocular (Arcano<sup>®</sup> Ztx) y se siguió la tabla de desarrollo normal propuesta por Gosner (1960).

### 3.4. Plaguicidas seleccionados

Un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas, animales o microorganismos indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y sus productos, alimentos para animales o que se pueden administrar a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en, o sobre sus cuerpos (FAO/WHO, 2010). El término abarca todos los ingredientes activos en cualquiera de sus formas, sin considerar si fueron formulados para su aplicación. Incluye también las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro que se genera durante el almacenamiento y transporte, pero no así los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal ni aditivos alimentarios

En este trabajo de tesis, los plaguicidas utilizados fueron 1) el insecticida Fenitrothion (Hormigal-L<sup>®</sup>, Agroparque S.R.L., Argentina; CAS N° 122-14-5; 10% de ingrediente activo [i.a.]), 2) el herbicida Glifosato (Roundup UltraMax<sup>®</sup>, Monsanto Argentina S.A.I.C., Argentina; CAS N° 1071-83-6; 74,7% i.a.) y 3) el fungicida Trifloxistrobin (Flint 50 WG<sup>®</sup>, Bayer CropScience A.G., Argentina; CAS N° 141517-21-7; 50% i.a.). Las formulaciones comerciales de los tres agroquímicos fueron utilizadas en lugar de sus correspondientes principios activos, ya que varios estudios demostraron que los ingredientes inertes contenidos en las formulaciones pueden contribuir a la toxicidad de los anfibios (por ejemplo, Mann y Bidwell, 1999; 2001; Relyea y Jones, 2009; Lajmanovich y col., 2010).

Las soluciones de ensayo se prepararon a partir de una solución madre de cada plaguicida, que consiste en una solución de alta concentración, a partir de la cual se elaboran soluciones menos concentradas (US.EPA, 1991). Para preparar la solución madre, cada producto comercial fue diluido en agua destilada teniendo en cuenta la concentración del ingrediente activo en el formulado. Las concentraciones analizadas de cada compuesto se prepararon,

previamente a cada ensayo, disolviendo concentraciones específicas de las respectivas soluciones madre en agua de red de clorinada.

### 3.4.1. Fenitrotion

Fenitrotion (O,O-dimetil, O-[3-metil-4-nitrofenil] fosforotioato) es un insecticida organofosforado de acción sistémica ampliamente utilizado en la agricultura para el control de insectos en los cultivos de arroz y girasol, cereales, frutas, verduras, en grano almacenado y algodón, así como también en áreas forestales (CASAFE, 2007). Una característica común en los plaguicidas organofosforados es que se degradan con mayor facilidad, y eso los hace compuestos poco persistentes en el ambiente y en los sistemas biológicos (Racke, 1992; Hill, 1995). La vida media del fenitrotion en agua es de 24 a 48 h, ya que se descompone por fotólisis e hidrólisis en sus principales metabolitos (3-metil-4-nitrofenol y fenitrooxon) (Chanda y col., 2006). Sin embargo, han sido detectadas concentraciones de 0,2 mg/l de fenitrotion en aguas lénticas de New Brunswick (Canadá) a pocas horas de transcurrida la pulverización (Fairchild y col., 1989), alcanzando concentraciones máximas de hasta 2,5 mg/l en la capa superficial de pequeñas lagunas (Ernst y col., 1991).

Su mecanismo de acción consiste en la inhibición irreversible de las colinesterasas, lo que impide la degradación de la acetilcolina, un neurotransmisor que se encarga de facilitar la transmisión de impulsos nerviosos entre diferentes neuronas, ejerciendo su efecto en la hendidura sináptica (unión de dos neuronas). De este modo, se produce una acumulación excesiva de acetilcolina en las uniones colinérgicas neuroefectoras, mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos y en el sistema nervioso central, produciendo una sobreestimulación de los receptores colinérgicos, también llamada crisis colinérgica.

Según estudios ecotoxicológicos, fenitrotion presenta de moderada a alta toxicidad aguda. Es considerado altamente tóxico para abejas, arañas e invertebrados acuáticos como *Daphnia magna* (Fawell y Hedgecote, 1996; Sakai, 2002), y moderadamente tóxico para peces ( $Cl_{50-96 h} = 1,7$  mg/l para *Salvelinus fontinalis*; 2.1 mg/l para *Oryzias latipes*; 2.6 mg/l para *Mugil cephalus* y 3,8mg/l para *Lepomis macrochirus*;  $Cl_{50-48 h}$  entre 2,0 y 4,1 mg/l para *Cyprinus carpio*). En la anguila europea (*Anguilla anguilla*) expuesta a una concentración subletal de 0,04 mg/L de fenitrotion, Sancho y col. (1998) observaron un fenómeno de relajación o distensión muscular, conocido también como “muscle twitches”. Efectos subletales como actividad natatoria anormal, parálisis, reducción del crecimiento y retraso en el desarrollo, también fueron observadas en larvas de anfibios expuestas a concentraciones entre 0,2 y 5,5

mg/l de fenitrothion en estudios de laboratorio (Berrill y col., 1994). En larvas de anfibios, se informan efectos letales para *Rana clamitans* con valores que van desde 4,9 mg/l (Cl<sub>50</sub>-96 h) y 9,9 mg/l (Cl<sub>50</sub>-24 h).

### 3.4.2. Glifosato

Glifosato (N-fosfonometil glicina) es un herbicida sistémico y de amplio espectro, extensamente utilizado en agricultura y también en ambientes forestales, jardines y en la industria de la madera, para el control no selectivo de malezas anuales y perennes, gramíneas y latifoliadas (US.EPA, 1986; WHO, 1994). El glifosato ingresa a las plantas por las partes verdes, principalmente las hojas, y se traslada a todo el vegetal a través de xilema y floema. Su mecanismo de acción tiene lugar a través de la alteración de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Es un inhibidor de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato (EPSP) sintetasa, que cataliza la formación de un precursor de la biosíntesis de tres aminoácidos esenciales para la supervivencia de la planta: triptófano, fenilalanina y tirosina. Esta vía metabólica está presente en las plantas superiores y ciertos microorganismos, pero es inexistente en animales (Atkinson, 1985; Giesy y col., 2000; Monroy y col., 2005).

Glifosato representa el 83% del total de herbicidas utilizados en Argentina (CASAFE, 2010). La mayor proporción de uso de herbicidas en Argentina en relación con el resto del mundo depende casi exclusivamente al mayor uso de glifosato (Hang y col., 2010). La formulación comercial a base de glifosato más conocida es Roundup®, introducida por primera vez en el país en 1974 por la empresa multinacional Monsanto (Franz y col., 1997). La utilización de glifosato en Argentina creció en forma exponencial desde la incorporación a la agricultura de la soja transgénica (soja RR), en el año 1996-1997. Estas variedades transgénicas poseen una EPSP sintetasa que no es inhibida por el glifosato, de manera que el herbicida puede ser aplicado en cualquier etapa del crecimiento del cultivo, sin producir daño al mismo.

Este herbicida se aplica inicialmente en lo que se denomina barbecho químico, con una o dos aplicaciones antes de la siembra del cultivo o en preemergencia, para eliminar las malezas que consumen agua y nutrientes, favoreciendo las condiciones de emergencia e implantación del mismo (Arregui y col., 2010). Posteriormente, se realizan una o más aplicaciones en postemergencia, principalmente durante el período vegetativo, momento en el que es indispensable mantener los cultivos libres de maleza para evitar la competencia y lograr el máximo crecimiento (Hang y col., 2010). Además, el uso de glifosato no se limita únicamente a la soja transgénica, sino que es aplicado como herbicida total en otros cultivos como maíz,

girasol, algodón, arroz y trigo, así como en plantaciones de árboles frutales. Luego del éxito de la introducción de la soja RR, otros cultivares han sido genéticamente modificados para generar resistencia al glifosato, entre ellos el algodón (2001) y el maíz (2005) (MAGyP, 2010).

En la actualidad, numerosas investigaciones han reportado la presencia del glifosato en sistemas acuáticos (Feng y col., 1990; Newton y col., 1994; Couture y col., 1995; Chen y col., 2004). En nuestro país, Peruzzo y col. (2008) determinaron niveles de glifosato en sedimentos y suelo obteniendo valores entre 0,5 y 5,0 mg/Kg, y en agua con valores entre 0,10 y 0,70 mg/l, pudiendo alcanzar concentraciones mayores en cuerpos de agua pequeños y de escasa profundidad, donde se han registrado valores entre 3,8 y 10,1 mg/l (Couture y col., 1995; Mann y Bidwell, 1999; Perkins y col., 2000).

Desde el punto de vista ecotoxicológico, glifosato es considerado como un producto prácticamente no tóxico para peces e invertebrados acuáticos y, levemente tóxico, para aves y mamíferos. Asimismo, los anfibios anuros son considerados como los organismos vertebrados más sensibles a glifosato, reportándose para larvas de varias especies concentraciones letales dentro del rango entre 1,33 y 13,33 mg/l (Govindarajulu, 2008). Diferentes autores atribuyen la toxicidad de las formulaciones de glifosato a los compuestos surfactantes (e.g. solventes, emulsionantes, tensoactivos, etc.) utilizados para aumentar su eficiencia a campo y no al glifosato en su forma pura (Folmar y col., 1979; Mann y col., 2003), mientras que otros, a las altas concentraciones utilizadas en los ensayos de toxicidad realizados a nivel experimental (Williams y col., 2000; Thompson y col., 2006). Sin embargo este argumento ya fue refutado por Williams y Semlitsch (2010), quienes comprobaron que la exposición a niveles muy bajos del herbicida Roundup Weather Max® (762 µg/l) produjo la muerte del 80% en larvas de anfibios expuestas a glifosato. También, Paganelli y col. (2010) demostraron efectos teratogénicos vinculados con un incremento del ácido retinoico en embriones de *Xenopus laevis* incubados con dosis de Roundup® correspondiente a una dilución de la formulación de 1/5000.

### 3.4.3. Trifloxistrobin

El fungicida Flint®, cuyo ingrediente activo es el trifloxistrobin (metoximino-{2-[1(3-trifluorometil-fenil-)-etilidenamino-oximetil]-fenil}-metiléster del ácido acético), pertenece a la nueva generación de fungicidas de la familia de las estrobilurinas. Posee actividad mesóstemica, ya que parte del producto se deposita sobre la superficie foliar, y desde allí va liberando pequeñas cantidades muy activas, en forma de vapor, tanto hacia el exterior con redeposición en

otros sectores de la hoja. De esta manera mantiene por más tiempo el cultivo sano y verde, con el consecuente mejoramiento en el rendimiento final (CASAFE, 2007). Este fungicida de amplio espectro actúa sobre las mitocondrias de las células de los hongos, interrumpiendo el flujo de electrones en el enlace del Complejo III. Como consecuencia, la producción de ATP es reducida. Como el ATP es la principal fuente de energía, importantes procesos bioquímicos de las células son afectados, el crecimiento celular se detiene y al final, el hongo muere.

La acción mesostémica del trifloxistrobin (TFS) produce un potente efecto preventivo de las enfermedades foliares (royas, oídio, mancha amarilla y septoria) que afectan el rendimiento y repercuten sobre la calidad y rentabilidad de los cultivos (soja, manzanos, ciruelos, bananos, mangos, plantas ornamentales, hortalizas). Además, su novedoso modo de acción y la gran afinidad del producto con la copa de la hoja, permiten mantener un nivel constante, equilibrado y sumamente efectivo del producto por más tiempo, ofreciendo una excelente acción residual (Gisi y col., 2000; Reuveni, 2000).

TFS es poco soluble en solución acuosa. Presenta un tiempo de vida media en suelo que varía de 5 a 110 días (Deb y col., 2010), aunque rápidamente es degradado en agua, con un tiempo de vida media entre 16,8 y 31,2 h (Banerjee y col., 2006), motivo por el cual pocas veces ha sido detectado en ambientes acuáticos (Battaglin y col., 2010). Sin embargo, su principal metabolito [(E,E)-trifloxistrobin ácido] si es soluble en agua, poniendo en riesgo de exposición a estos productos a los organismos a través de la pulverización directa, el transporte atmosférico, la escorrentía, y el desplazamiento de los animales en los sitios agrícolas durante la aplicación (Belden y col., 2010).

De acuerdo a datos ecotoxicológicos, TFS es considerado no tóxico para aves, mamíferos, abejas, otros insectos beneficiosos y lombrices de tierra (CASAFE, 2007). Sin embargo, ha sido clasificado como muy tóxico para los organismos acuáticos no blanco. Por ejemplo, la concentración letal media ( $Cl_{50}$  96-h) para la trucha *Oncorhynchus mykiss* osciló entre 15 y 78  $\mu\text{g/l}$ , para el pez *Lepomis macrochirus* fue de 25  $\mu\text{g/l}$  y para el crustáceo marino *Mysidopsis bahia* la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) varió de 9 a 34  $\mu\text{g/l}$  (APVMA, 2000). En larvas y juveniles de *Bufo cognatus*, Belden y col. (2010) evaluaron la toxicidad del formulado comercial Stratego®, que contiene como ingrediente activo a TFS, utilizando tres niveles de exposición relacionados con la dosis recomendada de aplicación a campo (880 ml/ha, nivel medio = 74  $\mu\text{g}$  de TFS/l). En nivel inferior fue un décimo (1/10) de la dosis recomendada (7,4  $\mu\text{g}$  de TFS/l), mientras que el nivel superior fue 10 veces más del valor recomendado (740  $\mu\text{g}$  de TFS/l). La concentración más alta fue letal para el 100% de las larvas y juveniles; la concentración media el causó la muerte del 40% de los renacuajos y el 15% de los juveniles,



mientras que la menor concentración provocó la mortalidad del 5% de las larvas, no causando efectos letales sobre los juveniles. Utilizando renacuajos de la misma especie, Hooser y col. (2012) compararon la toxicidad aguda de TFS como ingrediente activo (i.a.) con la de la formulación Stratego®, no encontrando diferencias significativas entre los valores de  $LC_{50}$  a 72-h (100,3  $\mu\text{g/l}$  y 104,1  $\mu\text{g/l}$ , respectivamente).

### **3.5. Diseño experimental**

El trabajo fue organizado en tres etapas: la primera de ecotoxicidad, la segunda de exposición, y la tercera de ensayos de depredación y evaluación de respuestas. La primera etapa consistió en evaluar la toxicidad de los organismos frente a los tres plaguicidas (F, Gly y TFS), para de esta manera establecer las concentraciones subletales de exposición a emplear en la evaluación de respuestas. En una segunda etapa, se realizó la exposición de depredador y presa a plaguicidas y a agua de clorinada. Y finalmente, tras la exposición de los organismos, se llevaron a cabo ensayos de depredación directa utilizando grupos de individuos (depredador y presas) expuestos y no expuestos a plaguicidas, sobre los cuales se evaluaron y contrastaron las respuestas etológicas y metabólicas.

#### **3.5.1. Primera etapa: Ecotoxicidad**

Los plaguicidas pueden ser arrastrados superficialmente con el agua o junto con las partículas de suelo erosionado (escorrentía), hasta llegar a los cursos de agua. También pueden ser transportados por el viento (deriva), o infiltrarse en el perfil del suelo (percolación o lixiviación) por el movimiento del agua (Hang y col., 2010). Argentina todavía cuenta con un profundo vacío de información respecto de las concentraciones residuales de plaguicidas presentes en cuerpos de agua superficiales, y en consecuencia, con parámetros de protección para las especies nativas. Por tal motivo, los datos obtenidos mediante la realización de ensayos de ecotoxicidad son fundamentales para establecer criterios que permitan la protección de nuestras especies (Jager y col., 2006; Heugens y col., 2001).

Es por ello que en el presente trabajo, el primer paso consistió en realizar pruebas de toxicidad aguda para estimar el rango de concentraciones de cada xenobiótico evaluado (F, Gly y TFS) que produce una respuesta observable y cuantificable en los organismos bajo condiciones controladas de laboratorio (Rand y Petrocelli, 1985). En estos casos, la respuesta indicadora más utilizada es la mortalidad, siendo la medida estimativa de toxicidad la concentración que produce

el 50% de la mortalidad de los organismos luego de un período definido de exposición, conocida como  $CL_{50}$  (concentración letal media).

### 3.5.1.1. *Procedimiento experimental*

Con el propósito de estimar los efectos tóxicos de los plaguicidas (F, Gly y TFS) en especies nativas de anfibios, se realizaron ensayos estáticos de toxicidad aguda. Los mismos se desarrollaron en la Sala de Bioensayos del Laboratorio de Ecotoxicología de la FBCB-UNL, por triplicado, y bajo condiciones controladas (temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y fotoperíodo 12/12 horas luz/oscuridad).

Para la realización de los bioensayos, se prepararon al menos cinco concentraciones del plaguicida a ensayar, matemáticamente relacionadas por un factor de dilución, y un control negativo (sin plaguicida). El rango de concentraciones analizadas se determinó considerando la información obtenida a partir de ensayos preliminares. Por cada concentración, siete larvas de anfibios en estadios 36-41 (Gosner, 1960) fueron colocadas aleatoriamente en frascos de vidrio (12,5 cm de diámetro y 13,5 cm de altura) conteniendo la solución de ensayo de cada plaguicida, siendo el volumen total el mismo en todas las unidades experimentales (1 litro). En ningún caso se adicionó alimento durante el período de ensayo (US.EPA, 1989; 2002). La medida considerada fue la muerte, reconocida por la ausencia de respuesta al ser estimulados con una varilla de vidrio, que fue registrada a las 24 h.

El mismo procedimiento fue aplicado para las 9 especies de anfibios evaluadas (*Rhinella arenarum*, *Leptodactylus latrans*, *L. chaquensis*, *Physalaemus santafecinus*, *P. albonotatus*, *P. riograndensis*, *Trachycephalus typhonius*, *Hypsiboas pulchellus* y *Elachistocleis bicolor*), y para cada uno de los plaguicidas utilizados: F, Gly y TFS, respectivamente.

La sensibilidad de los organismos a cada plaguicida se expresó como la concentración en la cual el compuesto tóxico causa la mortalidad del 50% de los individuos, luego de 24 h de exposición ( $CL_{50-24h}$ ). Para la estimación de la  $CL_{50}$  y sus respectivos intervalos de confianza (IC;  $\alpha = 0,05$ ), se utilizó el programa Spearman-Kärber (Hamilton, 1977). Asimismo, se determinó la concentración mínima donde aun se observa efecto de mortalidad (LOEC, por sus siglas en inglés “*Lower Observable Effect Concentration*”) y la concentración donde el tóxico no produce la muerte de los organismos (NOEC, por sus siglas en inglés “*No Observable Effect Concentration*”). Estos parámetros de ecotoxicidad se obtuvieron comparando las respuestas en cada concentración contra los controles, mediante ANOVA de una vía y el post-test de Dunnett utilizando el software SPSS Statistics 17.0.

Posteriormente, se estimó para cada plaguicida la concentración de peligro para el 5% de las especies expuestas o HC<sub>5</sub> por sus siglas en inglés: “*Hazardous Concentration*”. Estas concentraciones se estimaron con el programa BurrliOZ 1.0.14 (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation [CSIRO]) que utiliza la distribución de tipo III de Burr (Shao, 2000), a partir de datos experimentales de NOEC obtenidos en los ensayos de ecotoxicidad para cada especie de larvas de anfibios.

### **3.5.2. Segunda etapa: Exposición de depredador y presa a los plaguicidas**

Como fuera señalado anteriormente, la incorporación de sustancias xenobióticas a los ecosistemas no es la suficiente para causar la muerte fisiológica de los organismos (Davidson, 2004; Fellers y col., 2004), pero sí capaz de afectar su funcionamiento en un contexto ecológico, denominada muerte ecológica (Scott y Sloman, 2004). Por lo cual, para evaluar las respuestas de los organismos a los plaguicidas fue necesario definir un parámetro de exposición subletal, que sea lo suficientemente sensible para detectar cambios en las respuestas evaluadas, y que a su vez, posea realismo ambiental (Chapman y col., 1998; Chapman y Loehr, 2003; Dale y col., 2008; DeForest y col., 2008; Page y col., 2012).

#### **3.5.2.1. Parámetro de exposición**

En este trabajo, el criterio seleccionado para la exposición de los organismos consistió en considerar a la concentración más baja de efectos observables (LOEC), calculada previamente para cada especie de renacuajo mediante los ensayos de ecotoxicidad, como la concentración subletal de exposición de la dupla depredador-presa, y posterior parámetro de evaluación de respuestas etológicas y metabólicas.

Con la aplicación de este criterio se plantean escenarios del peor caso posible, principalmente para la presa, ya que la LOEC es la toxicidad inicial umbral de un producto químico. Sin embargo, estos escenarios representan situaciones que se acercan mucho a condiciones reales que padecen los organismos acuáticos, entre ellos las larvas de anfibios y los peces, si se consideran las dosis de aplicación recomendadas para los plaguicidas, que en todos los casos son mucho mayores que las aquí utilizadas. Sólo a modo de ejemplo, las dosis de aplicación recomendadas de Gly (Roundup Ultra Max<sup>®</sup>) para cultivos de soja se encuentran en el intervalo de 0,8 a 3,2 kg/ha (CASAFE, 2007), las que para su aplicación deben ser diluidas en

100 l/ha. Dado que el formulado posee un 74,7% de Gly, en una aplicación de 1 kg/ha, la concentración resultante en la misma es de 7470 mg/l.

### 3.5.2.2. Procedimiento experimental

La exposición de depredador y presa es la etapa previa al inicio de los ensayos de depredación y de evaluación de respuestas (etológicas y metabólicas), y tiene como objetivo clasificar a depredador y presa en dos tratamientos: expuestos a cada uno de los plaguicidas (F, Gly y TFS) y no expuestos al plaguicida. Esta etapa fue realizada en condiciones de laboratorio ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y fotoperíodo 12 h de luz y 12 h de oscuridad).

Para las experiencias se emplearon juveniles de *S. marmoratus* (media  $\pm$  ds Longitud Hocico Cloaca [LHC]:  $9,72 \pm 1,94$  cm; Longitud Total [LT]:  $17,69 \pm 1,38$ ; Masa Corporal [MC]:  $13,47 \pm 2,28$  g) y larvas de anfibios en prometamorfosis, principalmente de tamaños similares (Tabla 1).

**Tabla 1:** Descripción de las características morfológicas de las larvas de anfibios utilizadas para todas las experiencias. H-TP: Longitud hocico-base del tubo proctodeal; LT: Longitud total; MC: Masa corporal; ED: estadio de desarrollo según Gosner.

Especies	H-TP (cm $\pm$ ds)	LT (cm $\pm$ ds)	MC (g $\pm$ ds)	ED (Gosner)
<i>Rhinella arenarum</i>	$0,91 \pm 0,12$	$2,65 \pm 0,38$	$0,166 \pm 0,025$	36-38
<i>Leptodactylus latrans</i>	$0,93 \pm 0,09$	$3,05 \pm 0,24$	$0,266 \pm 0,013$	36-37
<i>Leptodactylus chaquensis</i>	$0,87 \pm 0,08$	$3,00 \pm 0,25$	$0,161 \pm 0,024$	36-37
<i>Physalaemus albonotatus</i>	$0,81 \pm 0,12$	$2,86 \pm 0,26$	$0,205 \pm 0,032$	36-38
<i>Physalaemus santafecinus</i>	$0,69 \pm 0,052$	$2,77 \pm 0,23$	$0,186 \pm 0,077$	36-38
<i>Physalaemus riograndensis</i>	$0,78 \pm 0,063$	$2,90 \pm 0,20$	$0,191 \pm 0,063$	36-38
<i>Trachycephalus typhoni</i>	$1,11 \pm 0,12$	$3,20 \pm 0,16$	$0,294 \pm 0,051$	36-37
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	$1,00 \pm 0,082$	$3,10 \pm 0,20$	$0,222 \pm 0,063$	36-38
<i>Elachistocleis bicolor</i>	$1,00 \pm 0,2$	$2,90 \pm 0,23$	$0,199 \pm 0,032$	37-38

Para el tratamiento de exposición a los plaguicidas y previo al inicio de éste, se preparó una solución madre de F, Gly y TFS, respectivamente. Las concentraciones de exposición se obtuvieron disolviendo volúmenes específicos de las respectivas soluciones madre en agua de red

dechlorinada. Por su parte, el volumen de exposición se calculó considerando la capacidad de carga de los organismos expuestos.

Para los ensayos de depredación, la dupla anguila- renacuajos fue expuesta a la LOEC del renacuajo, simulando la presencia del plaguicida en el cuerpo de agua donde coexisten depredador y presa. Las concentraciones de exposición de cada especie de renacuajo a los respectivos plaguicidas se pueden observar en la Tabla 2. El mismo criterio de exposición fue considerado para evaluar las respuestas etológicas y metabólicas de las larvas de anfibios.

Para la evaluación de las respuestas metabólicas de los depredadores, éstos fueron expuestos a los valores extremos (menor y mayor) de LOEC de los renacuajos obtenidos por plaguicida, los cuales se muestran a continuación en la Tabla 2. Este criterio fue seleccionado en función de los resultados obtenidos en ensayos preliminares (Junges y col., 2010) y para evitar introducir en los resultados diferencias ocasionadas por la variabilidad entre los depredadores, y no debido al efecto real de la exposición a plaguicidas, cuando entre concentraciones de exposición existen diferencias no apreciables (ver Tabla 2).

**Tabla 2:** Concentraciones de exposición (en mg/l) a fenitrotion, glifosato y trifloxistrobin sobre las que se evaluaron los efectos en la interacción depredador-presa, respuestas etológicas y metabólicas en larvas de anfibios. Se muestran en color azul las concentraciones más bajas y en rojo las más altas de cada plaguicida a las que fue expuesta *Synbranchus marmoratus* (depredador), para evaluar las respuestas metabólicas.

<b>Especies</b>	<b>mg/l</b>	<b>Fenitrotion</b>	<b>Glifosato</b>	<b>Trifloxistrobin</b>
<i>R. arenarum</i>	LOEC	2,20	10,00	0,125
<i>L. latrans</i>	LOEC	2,97	12,20	0,23
<i>L. chaquensis</i>	LOEC	2,90	<b>21,5</b>	0,23
<i>P. albonotatus</i>	LOEC	2,00	9,50	0,125
<i>P. santafecinus</i>	LOEC	2,00	10,00	0,125
<i>P. riograndensis</i>	LOEC	2,00	10,40	0,15
<i>T. typhoni</i>	LOEC	<b>3,12</b>	15,0	<b>0,66</b>
<i>H. pulchellus</i>	LOEC	2,50	13,06	0,56
<i>E. bicolor</i>	LOEC	<b>2,00</b>	<b>2,50</b>	<b>0,096</b>

El tiempo de exposición de los organismos en todos los casos fue de 6 horas, tanto para depredador y presas. Este período fue seleccionado teniendo en cuenta experimentos

preliminares y trabajos previos que demuestran la elevada sensibilidad de los organismos para detectar exposiciones agudas a los contaminantes (Lajmanovich y col., 2010). Asimismo, este período permitió detectar efectos tempranos sin llegar a afectar o dañar la integridad de los individuos (muerte), como consecuencia de un mayor tiempo de exposición. Durante la exposición, los individuos no fueron alimentados.

Para la exposición de los organismos, una submuestra de 66 anguilas ( $n = 6$  para ensayos de depredación y 60 para respuestas metabólicas) y de 260 larvas de anfibios de cada especie ( $n = 120$  para depredación,  $n = 120$  para respuestas etológicas y metabólicas y  $n = 20$  para control de mortalidad post exposición) fue asignada aleatoriamente al tratamiento de exposición a cada plaguicida (F, Gly y TFS, respectivamente), mientras que otra submuestra de similares características (26 anguilas y 260 larvas de anfibios de cada especie) fue asignada al tratamiento de exposición a agua de red declorinada, grupo considerado no expuesto al plaguicida. En ambos tratamientos de exposición (al plaguicida y a agua de red declorinada) se utilizaron recipientes plásticos descartables de 40 cm de longitud, 26 cm de ancho, y 12 cm de altura.

Tras la exposición a cada plaguicida, los individuos se transfirieron a peceras con agua de red declorinada (libre de plaguicida) a la espera de ser empleados, a continuación, en ensayos de depredación y en la evaluación de respuestas etológicas y metabólicas.

Los depredadores expuestos y no expuestos a los plaguicidas destinados a la evaluación de respuestas metabólicas fueron fijados en frío a  $-20^{\circ}\text{C}$  conforme a los protocolos de Nickum y col. (2004), inmediatamente transcurrida 1 h y 24 h posteriores al período de exposición.

### **3.5.3. Tercera etapa: Ensayos de depredación y evaluación de respuestas**

Existe una diversidad de biomarcadores, o indicadores biológicos, que se utilizan para la evaluación de un organismo frente a distintas situaciones ambientales durante su vida (Lagadic y col., 1997; Van der Oost y col., 2003). Si tales situaciones representan un posible daño o peligro, el seguimiento de este tipo de biomarcadores puede brindar información valiosa para los programas de monitoreo biológico (US.EPA, 2002; Sánchez-Hernández, 2003; Sánchez-Hernández y col., 2004a; 2004b; Lajmanovich y col., 2004). El objetivo de esta etapa es evaluar si los plaguicidas inducen cambios en la interacción depredador-presa producto de la modificación de las respuestas etológicas y metabólicas de los organismos tras su exposición a los plaguicidas.

### 3.5.3.1. *Ensayos de depredación directa*

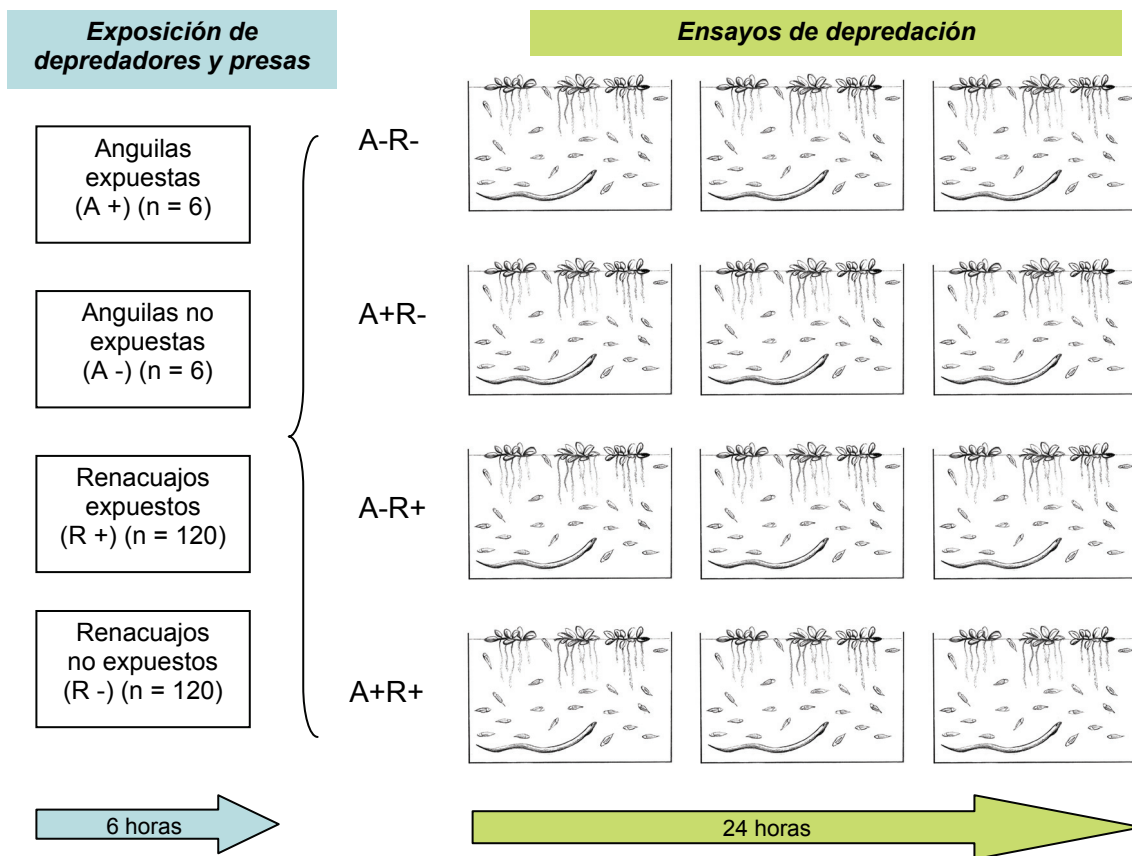
Debido a que la fenología reproductiva de algunas especies de anfibios es marcadamente estacional y breve, en algunos casos no fue posible disponer simultáneamente de larvas de anfibios de todas las especies, por lo tanto, los ensayos de depredación se realizaron por separado para cada especie presa disponible.

Para evaluar el efecto de los plaguicidas sobre la interacción depredador-presa, se estimó la tasa de depredación de las anguilas (A) sobre los renacuajos (R) expuestos (+) a Gly, F y TFS, y no expuestos (-), utilizando cuatro tratamientos: (1) anguilas y renacuajos no expuestos (A-R-), (2) anguilas expuestas y renacuajos no expuestos (A+R-), (3) anguilas no expuestas y renacuajos expuestos (A-R+), y (4) anguilas y renacuajos expuestos (A+R+).

Para ello, se acondicionó un total de 12 recipientes plásticos (40 cm de largo, 26 cm de ancho y 12 cm de altura) con 6 L de agua de red declorinada y 3 helechos acuáticos de *Salvinia herzogii* para proporcionar complejidad estructural (Figura 4). Luego del período de exposición (6 h), se distribuyó en cada recipiente 1 juvenil de anguila (depredador; expuesto o no al plaguicida, dependiendo del tratamiento) al que se le ofreció 20 larvas de anfibios como alimento (presas; expuestas o no). El ensayo se inició con la introducción de las anguilas en los recipientes, y se extendió por 24 h.

Los experimentos se realizaron en la Sala de Bioensayos del Laboratorio de Ecotoxicología de la FBCB-UNL, por triplicado, en una habitación con temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y con un fotoperíodo de 12 horas con luz y 12 horas de oscuridad.

La tasa de depredación se registró a 1, 6, 18 y 24 h del inicio de los ensayos, sobre las nueve especies de renacuajos, y fue calculada como la tasa de mortalidad instantánea de la presa según la fórmula  $z = -\ln(n_t/n_0)/t$ , donde  $n_0$  y  $n_t$  son las densidades de presa en el inicio y el final del experimento, y  $t$  es la duración de la prueba en horas (Bergström y Englund, 2002).



**Figura 4:** Esquema del diseño utilizado para los ensayos de depredación (24 h). Se consideraron cuatro tratamientos, variando la exposición o no (+ o -) de depredador (A) y presas (R) a plaguicidas, la cual se realizó durante 6 h, previo al inicio de los ensayos de depredación.

### 3.5.3.1.1. Monitoreo de los organismos durante los ensayos de depredación

Además de cuantificar la tasa de depredación a 1, 6, 18 y 24 h del inicio de los ensayos, se monitoreó la presencia de lesiones letales y/o subletales producidas por el depredador durante los intentos de captura de sus presas. Para tal efecto, se tipificaron como lesiones letales a aquellas que producen la muerte de las larvas de anfibios, sin su posterior ingestión; y subletales a las producidas por el depredador en los intentos de captura de la presa, pero que no causan su muerte. En ambos casos, las larvas que manifestaron lesiones no fueron retiradas de los recipientes de ensayo hasta finalizada la prueba (24 h). Asimismo, las lesiones se clasificaron según la región del cuerpo donde fueron localizadas (Van Buskirk y col., 2003).

Paralelamente, durante el transcurso de los ensayos de depredación, y con el objetivo de descartar mortalidad de las larvas de anfibios por cualquier causa, excepto la depredación, se monitoreó la muerte de los renacuajos no expuestos a plaguicidas (mortalidad natural) y la muerte de los renacuajos posterior a la exposición subletal al plaguicida (LOEC-6h). Para ello, en simultáneo con los ensayos de depredación, 20 renacuajos del grupo control, y 20 renacuajos



previamente expuestos a la LOEC del plaguicida ensayado, se colocaron en 2 peceras diferentes con 6 litros de agua de red de clorinada. En ambas peceras, la mortalidad, si la hubiere, se registró a 1, 6, 18 y 24 h del inicio de los ensayos.

### 3.5.3.1.2. Análisis estadístico

Para determinar la influencia de las especies (*R. arenarum*, *L. latrans*, *L. chaquensis*, *P. albonotatus*, *P. santafecinus*, *P. riograndensis*, *T. typhoni*, *H. pulchellus* y *E. bicolor*), los plaguicidas (F, Gly y TFS) y los tratamientos (A-R-, A+R-, A-R+ y A+R+) sobre la tasa de depredación se realizó un ANOVA (Análisis de la varianza) de tres factores para cada tiempo (1, 6, 18 y 24 h), ya que la densidad de larvas disponibles en cada tiempo depende de la cantidad de larvas consumidas en el tiempo que lo precede. Se efectuó un total de cuatro ANOVAS con sus respectivos test *a posteriori* de Tukey. Previamente, se realizó un test de normalidad (Shapiro-Wilk) para cada una de las variables a fin de determinar si los datos se ajustaban a una distribución normal.

Para comparar la tasa de depredación entre renacuajos expuestos y no expuestos a plaguicidas se aplicó el test *t* de Student, al igual que para contrastar la tasa de depredación entre anguilas expuestas y no expuestas. Para ello, se confeccionó una nueva base de datos donde previamente se clasificaron las tasas de depredación según correspondan a renacuajos expuestos (R+) y no expuestos (R-), y a anguilas expuestas (A+) y no expuestas (A-). Se consideraron las tasas de depredación de R+ a la suma individual de las tasas de depredación de los tratamientos A-R+ y A+R+ considerando las nueve especies y los tres plaguicidas (n = 162). Mientras que, las tasas de depredación de R- fueron aquellas obtenidas mediante la suma de las tasas de depredación de los tratamientos A-R- y A+R- (de las nueve especies y los tres plaguicidas, n = 162). Por su parte, se agrupó la tasa de depredación correspondiente a los tratamientos A+R- y A+R+ (de las nueve especies y los tres plaguicidas, n = 162), las que fueron consideradas tasas de depredación de A+. De igual forma, se designó como la tasa de depredación de A-, a aquellas provenientes de los tratamientos A-R+ y A-R- (de las nueve especies y para los tres plaguicidas, n = 162). Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS Statistics versión 17.0. En todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas a valores de  $p < 0,05$

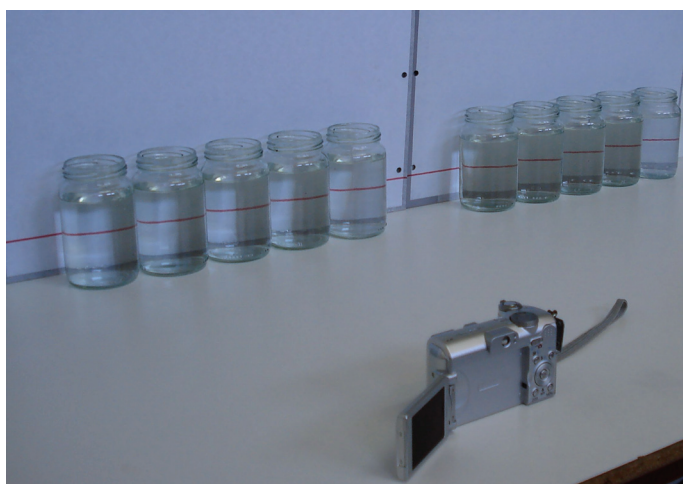
A su vez, la prevalencia de las lesiones letales y/o subletales producidas por el depredador durante los intentos de captura de sus presas se analizó mediante test de Chi-cuadrado ( $X^2$ ), utilizando el programa R.

### 3.5.3.2. Evaluación de respuestas etológicas

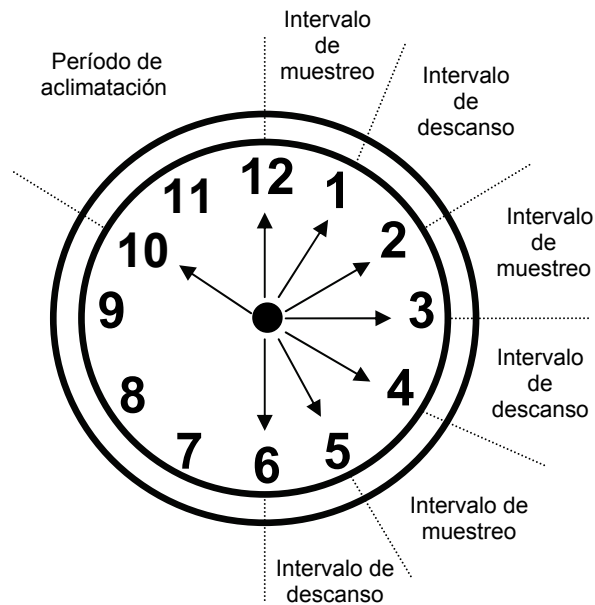
La evaluación de respuestas etológicas se llevó a cabo con el objetivo de determinar cambios en el comportamiento de las larvas de anfibios como consecuencia de la exposición subletal (LOEC-6h) a los plaguicidas F, Gly y TFS. Las mismas se realizaron con larvas que se encontraban previamente expuestas a concentraciones subletales (LOEC-6h) de los plaguicidas F, Gly y TFS, y larvas expuestas a agua declorinada, también llamadas larvas no expuestas o controles. El diseño experimental consistió en dos tratamientos por especie (larvas expuestas y no expuestas a los plaguicidas) replicados 10 veces para cada tiempo analizado (1, 6, 18 y 24 h).

En condiciones de laboratorio, diez larvas de cada tratamiento se colocaron individualmente en frascos de vidrio con 300 ml de agua declorinada y se dejaron aclimatar durante 10 minutos. Cada frasco presentaba delineado una línea media horizontal delimitando dos cuadrantes (Figura 5). Transcurrido el período de adaptación, las larvas fueron filmadas mediante cámaras Sony Cyber-Shot DSC-W35/W55 y Canon PowerShot A630 (Figura 5) en 3 intervalos de 5 minutos durante un lapso de media hora (15 minutos de puntos de muestreo) (Figura 6).

Cada individuo fue utilizado una sola vez ( $n = 10$  por tratamiento y por tiempo, en total  $n = 180$ ) y finalizada la experiencia las larvas fueron inmediatamente eutinizadas en frío (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) según protocolos estandarizados de ASIH y col. (2004), permaneciendo congeladas por no más de 30 días, hasta el momento de ser utilizadas en la evaluación de respuestas metabólicas.



**Figura 5:** Registro del comportamiento de las larvas de anfibios mediante filmaciones. En la imagen, cámara Canon PowerShot A630.



**Figura 6:** Esquema representativo del diseño experimental utilizado para cuantificar la respuesta etológica de las especies presa, expuestas y no expuestas a los plaguicidas.

El comportamiento de las larvas fue analizado teniendo en cuenta dos parámetros: la *actividad natatoria*, definida como cualquier movimiento de desplazamiento realizado por el renacuajo que modifique su posición vertical en el agua, y la *respiración* o *bubbling* (Wassersug y Seibert, 1975; Wassersug, 1992), entendida como el número que veces que el renacuajo cruzó la columna de agua para respirar aire atmosférico. La actividad natatoria se calculó por individuo, como la media de los tres intervalos de muestreo del número de veces que el cuerpo entero del renacuajo atravesó la línea horizontal. De la misma manera, se cuantificó la media del número de veces que cada renacuajo cruzó la columna de agua para respirar para los 15 minutos de puntos de muestreo.

### 3.5.3.2.1. Análisis estadístico

El primer paso consistió en corroborar la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk para cada una de las variables. En el caso de no presentar normalidad, los datos fueron transformados a raíz cuadrada (Pestana y col., 2009).

Para analizar la influencia de la exposición a los plaguicidas sobre la actividad natatoria y la respiración (variables dependientes) primero se realizó un MANOVA (Análisis multivariado de la varianza) por especie, utilizando el tiempo (1, 6, 18 y 24 h) y los tratamientos de exposición (Control, F, Gly y TFS) como factores. Seguidamente, se realizaron ANOVAs

(Análisis de la varianza) para cada variable dependiente cuando los valores de Wilk de los MANOVA fueron significativos ( $p < 0,05$ ). Posteriormente, las diferencias entre las medias fue evaluada mediante el test *a posteriori* de Tukey para el tiempo y de Dunnett para los tratamientos. Asimismo, se examinó para cada especie de anfibio la correlación entre la actividad natatoria con la respiración relacionada con la exposición a los plaguicida mediante la utilización de coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ; Zar, 1996). El software SPSS Statistics versión 17.0 fue utilizado para realizar el análisis estadístico de los datos.

### **3.5.3.3. Evaluación de respuestas metabólicas**

La evaluación de las respuestas metabólicas en depredadores y presas se llevó a cabo con el objetivo de determinar cambios en la actividad de dos enzimas ampliamente reconocidas como biomarcadores: la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BChE). El diseño experimental consistió en comparar la actividad enzimática de la AChE y la BChE entre los individuos de los dos tratamientos (expuestos y no expuestos a los plaguicidas) replicados diez veces para cada tiempo analizado (1, 6, 18 y 24 h para las larvas de anfibios; 1 y 24 h para los depredadores).

#### **3.5.3.3.1. Procesamiento de las muestras**

El procesamiento de las muestras consistió en seleccionar los tejidos de los depredadores y las presas, para posteriormente realizar las determinaciones bioquímicas correspondientes. En el caso de los depredadores, las determinaciones bioquímicas se realizaron sobre tejido muscular, obtenido mediante un corte en la zona dorsal-lateral izquierda de la anguila; mientras que en el caso de las larvas de anfibios, éstas fueron procesadas en su totalidad (cuerpo entero).

Los respectivos tejidos se homogenizaron en tubos eppendorf con 500  $\mu$ L de buffer de homogenización (25 mM Tris y 0,1% Triton, pH = 8), manteniendo el tubo eppendorf con la muestra en hielo. Posteriormente, se centrifugaron los homogenatos a 10.000 rpm durante 15 minutos. Por último, se descartó el pellet y el sobrenadante o extracto crudo, se transfirió a un nuevo tubo eppendorf.

A su vez, sobre cada sobrenadante se calculó la concentración de proteínas totales presentes, mediante el método de Biuret (Kingsley, 1942) utilizando el kit colorimétrico (Proteínas Totales AA, Winer lab<sup>®</sup>) para la determinación de proteínas totales.

### 3.5.3.3.2. Reactivos utilizados

Los sustratos acetiltiocolina (AcSCh) y butiriltiocolina (BuSCh), como el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, cromóforo) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich® (Alemania). Los reactivos Tris, Tritón y CaCl<sub>2</sub> fueron comprados en Biopack® (Argentina).

### 3.5.3.3.3. Actividad de la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa

La determinación enzimática de la AChE y la BChE se realizó por el método colorimétrico de Ellman y col. (1961) con algunas modificaciones para su utilización en especies silvestres (Sánchez-Hernández, 2003; Sánchez-Hernández y Moreno-Sánchez, 2002, Sánchez-Hernández y col., 1997, 2004a). La reacción incluyó 50 µl de la muestra, 890 µl de solución amortiguadora (Tris-HCl 25 mM/CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH = 7,6), 50 µl de DTNB ( $3 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, concentración final) y 10 µl del sustrato de la reacción (BuSCh,  $2 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> concentración final, o AcSCh). La variación en la densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro Jenway® 6405 UV-VIS y se midió por triplicado, a 412 nm, durante un minuto a 25°C. La actividad de la AChE y la BChE se expresó como la media±es de la cantidad de sustrato hidrolizado en nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteínas totales, utilizando el coeficiente de extinción molar de 14,15 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para la AChE, y 13,6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para la BChE.

### 3.5.3.3.4. Análisis estadístico

En primer lugar, se corroboró la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk para cada una de las variables, y posterior transformación de los datos a logaritmo natural (Ln) según corresponda.

Para analizar la influencia de la exposición a los plaguicidas sobre los niveles enzimáticos se realizó un MANOVA de dos factores por especie, utilizando los tratamientos de exposición (Control, F, Gly y TFS) y el tiempo (1, 6, 18 y 24 h para las larvas de anfibios; 1 y 24 h para el depredador) como factores, y las variables actividad de la AChE y la BChE como dependientes. Seguidamente, si los valores de Wilk del MANOVA fueron significativos ( $p < 0,05$ ), se realizaron ANOVAs para cada variable dependiente con el objetivo de determinar el efecto de cada factor sobre cada una de ellas. Las diferencias entre las medias fue evaluada mediante el test *a posteriori* de Tukey para el tiempo y de Dunnett para los tratamientos. El

software SPSS Statistics versión 17.0 fue utilizado para realizar el análisis estadístico de los datos.

### **3.5.4. Evaluación interespecífica de las variables analizadas**

Para cuantificar las distancias de similitud interespecíficas de las nueve especies de anuros de acuerdo a características propias ("*traits*"), ecotoxicológicas y a variables-respuesta (depredación, comportamentales y metabólicas) se realizaron análisis de distancia para cada tipo de plaguicida sobre la base del índice de Distancia Euclidiana Estandarizada (Dalrymple, 1988). Fue considerada como Unidad Taxonómica Operativa (OTU) (Sneath y Sokal, 1973) cada una de las nueve especies de anuros estudiadas, de modo que las matrices de datos originales contenían la información de cada caracter para cada OTU. Los caracteres fueron los siguientes: 1. LOEC; 2. estadio de desarrollo de las larvas (según Gosner, 1960); 3. longitud hocico-base del tubo proctodeal; 4. longitud total; 5. masa corporal; 6. tasa de depredación en la que depredador y presa fueron simultáneamente expuestos al plaguicida, considerando esta condición de relevancia ambiental; 7. actividad de la enzima AChE; 8. actividad de la enzima BChE; 9. actividad natatoria y 10. respiración. La matriz de datos fue tratada con técnicas de Taxonomía Numérica, obteniendo un fenograma a partir del método de Ligamiento Promedio de Pares de Grupos no Ponderados (UPGMA), que utiliza un algoritmo aglomerativo para realizar la clasificación (Crisci y López Armengol, 1983). Cabe destacar que es el método que menor distorsión provoca respecto de las distancias originales dentro de este tipo de algoritmos (Real y col., 1993). La medida de distorsión interna de la técnica se calculó aplicando el coeficiente de correlación cofenética (Sneath y Sokal, 1973). Estos procedimientos se realizaron con el programa de estadística multivariada MVSP (Kovach, 2003).

## **4. RESULTADOS**

---

### **4.1. Ecotoxicidad**

Los resultados ecotoxicológicos obtenidos para las larvas de anfibios según la exposición a los plaguicidas F, Gly y TFS se detallan en la Tabla 3. Cabe aclarar que durante los bioensayos, la mortalidad en los grupos control no excedió en ningún caso el 5% de los organismos expuestos.

**Tabla 3:** Concentraciones letales para el 50% de la población ( $CL_{50}$ , en mg/l) luego de 24 h de exposición a fenitrotion, glifosato y trifloxistrobin para las especies estudiadas se resaltan en negrita. Se muestran entre paréntesis los respectivos intervalos de confianza superior e inferior ( $\alpha = 0,05$ ) y los valores de NOEC y LOEC (en mg/l).

<b>Especie</b>		<b>Fenitrotion</b>	<b>Glifosato</b>	<b>Trifloxistrobin</b>
<b><i>R. arenarum</i></b>	<i>CL<sub>50</sub></i>	<b>2,57</b>	<b>13,20</b>	<b>0,22</b>
	<i>Int conf</i>	(2,42-2,73)	(11,57-15,05)	(0,19-0,25)
	<i>NOEC</i>	2,00	5,00	0,096
	<i>LOEC</i>	2,20	10,00	0,125
<b><i>L. latrans</i></b>	<i>CL<sub>50</sub></i>	<b>3,08</b>	<b>14,69</b>	<b>0,26</b>
	<i>Int conf</i>	(2,98-3,18)	(13,12-16,46)	(0,23-0,28)
	<i>NOEC</i>	2,67	9,76	0,18
	<i>LOEC</i>	2,97	12,20	0,23
<b><i>L. chaquensis</i></b>	<i>CL<sub>50</sub></i>	<b>3,47</b>	<b>22,85</b>	<b>0,29</b>
	<i>Int conf</i>	(2,62-4,58)	(18,42-27,74)	(0,19-0,35)
	<i>NOEC</i>	2,00	15,1	0,16
	<i>LOEC</i>	2,90	21,5	0,23
<b><i>P. albonotatus</i></b>	<i>CL<sub>50</sub></i>	<b>2,25</b>	<b>12,01</b>	<b>0,24</b>
	<i>Int conf</i>	(1,97-2,55)	(9,47-15,83)	(0,18-0,30)
	<i>NOEC</i>	1,40	5,70	0,0625
	<i>LOEC</i>	2,00	9,50	0,125
<b><i>P. santafecinus</i></b>	<i>CL<sub>50</sub></i>	<b>2,59</b>	<b>11,22</b>	<b>0,14</b>
	<i>Int conf</i>	(2,11-3,19)	(7,7-16,32)	(0,12-0,16)
	<i>NOEC</i>	1,40	5,00	0,096
	<i>LOEC</i>	2,00	10,00	0,125
<b><i>P. riograndensis</i></b>	<i>CL<sub>50</sub></i>	<b>2,79</b>	<b>12,43</b>	<b>0,17</b>
	<i>Int conf</i>	(2,27-3,43)	(10,38-14,88)	(0,15-0,19)
	<i>NOEC</i>	1,40	7,3	0,12
	<i>LOEC</i>	2,00	10,40	0,15
<b><i>T. typhoni</i></b>	<i>CL<sub>50</sub></i>	<b>3,65</b>	<b>17,92</b>	<b>0,89</b>
	<i>Int conf</i>	(3,22-4,14)	(13,62-23,57)	(0,70-1,13)
	<i>NOEC</i>	2,50	10,5	0,43
	<i>LOEC</i>	3,12	15,0	0,66
<b><i>H. pulchellus</i></b>	<i>CL<sub>50</sub></i>	<b>2,87</b>	<b>14,77</b>	<b>0,90</b>
	<i>Int conf</i>	(2,54-3,24)	(13,9-15,69)	(0,73-1,13)
	<i>NOEC</i>	1,75	11,76	0,39
	<i>LOEC</i>	2,50	13,06	0,56
<b><i>E. bicolor</i></b>	<i>CL<sub>50</sub></i>	<b>2,41</b>	<b>5,12</b>	<b>0,10</b>
	<i>Int conf</i>	(1,92-3,02)	(2,48-10,57)	(0,09-0,11)
	<i>NOEC</i>	1,40	1,25	0,077
	<i>LOEC</i>	2,00	2,50	0,096

El fungicida TFS fue el más tóxico para las larvas de anfibios, ya que presentó valores de  $CL_{50-24h}$  entre 0,1 y 0,9 mg/l. Le siguen en orden decreciente de toxicidad el insecticida F, para el que la  $CL_{50-24h}$  varió entre 2,25 mg/l y 3,65 mg/l, y el herbicida Gly, cuyos valores de  $CL_{50-24h}$  fueron entre 5,12 mg/l y 22,85 mg/l.

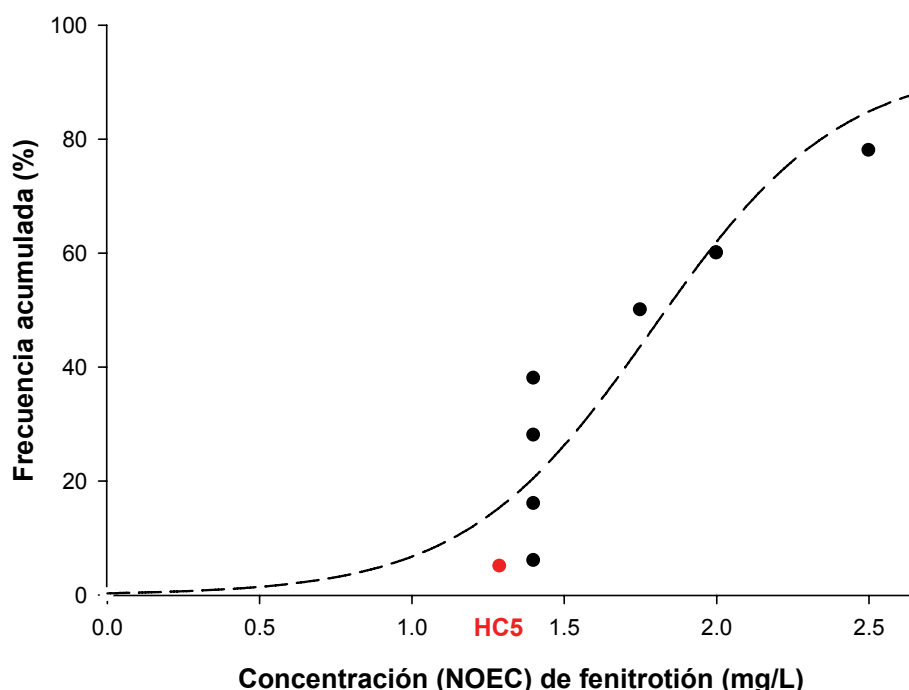
La sensibilidad de las especies de anfibios estudiadas también varió según el tipo de agroquímico al que fueron expuestas, dando lugar a los siguientes ordenamientos decrecientes en cuanto a su sensibilidad estimada mediante valores de  $CL_{50}$ :

**para F:** *P. albonotatus* < *E. bicolor* < *R. arenarum* < *P. santafecinus* < *P. riogransensis* < *H. pulchellus* < *L. latrans* < *L. chaquensis* < *T. typhonus*;

**para Gly:** *E. bicolor* < *P. santafecinus* < *P. albonotatus* < *P. riogransensis* < *R. arenarum* < *L. latrans* < *H. pulchellus* < *T. typhonus* < *L. chaquensis*; y

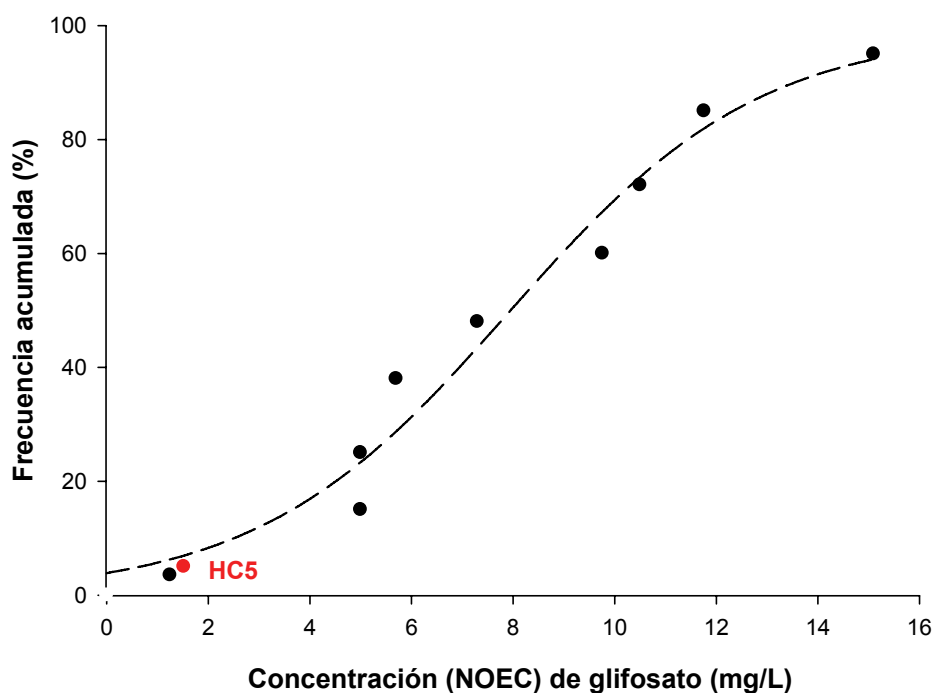
**para TFS:** *E. bicolor* < *P. santafecinus* < *P. riogransensis* < *R. arenarum* < *P. albonotatus* < *L. latrans* < *L. chaquensis* < *T. typhonus* < *H. pulchellus*.

Las concentraciones de niveles “seguros” de exposición a sustancias tóxicas individuales estimadas a través de la distribución Burr III de BurrliOZ fueron las siguientes: 1,28 mg/l para el insecticida F (Figura 7), 1,52 mg/l para el herbicida Gly (Figura 8) y 0,0617 mg/l para el fungicida TFS (Figura 9). Esto significa que, al considerar por ejemplo la concentración estimada (HC<sub>5</sub>) para F, 1,28 mg/l representa la concentración de F que asegura la protección para el 95% de las especies de anfibios que coexisten en un ambiente acuático potencialmente expuesto a tal insecticida.

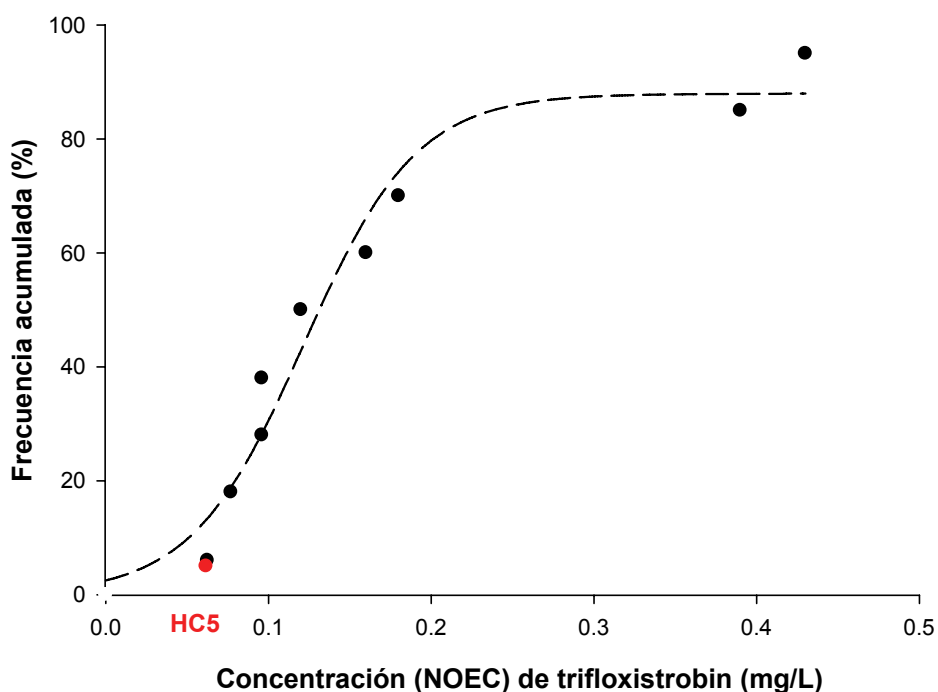


**Figura 7:** Valor crítico para el 5% de las especies de anuros (HC<sub>5</sub>) estimado mediante distribución BurrIII de BurliOz, que asegura la protección del 95% de las especies frente a una potencial exposición al insecticida fenitrotion.





**Figura 8:** Valor crítico para el 5% de las especies de anuros (HC5) estimado mediante distribución BurrIII de BurliOz, que asegura la protección del 95% de las especies frente a una potencial exposición al herbicida glifosato.

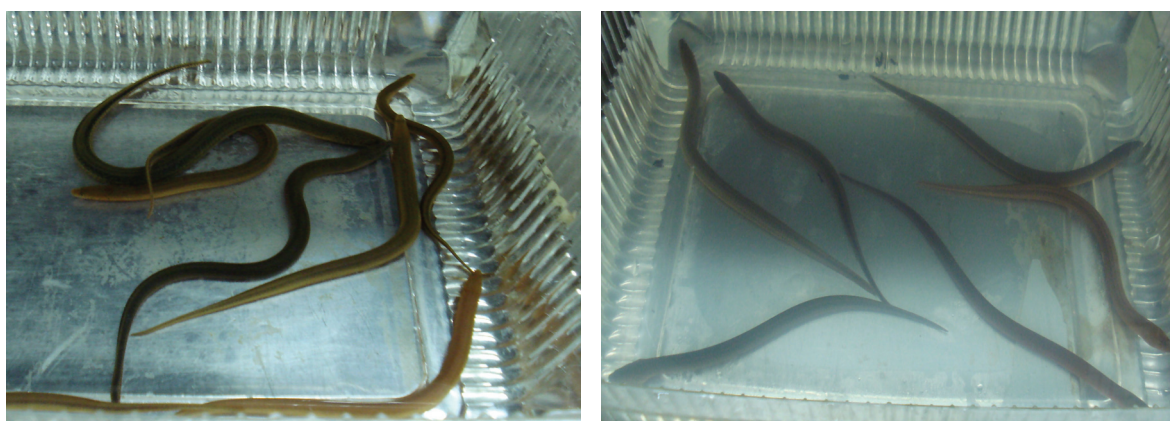


**Figura 9:** Valor crítico para el 5% de las especies de anuros (HC5) estimado mediante distribución BurrIII de BurliOz, que asegura la protección del 95% de las especies frente a una potencial exposición al fungicida trifloxistrobin.

## 4.2. Exposición de depredador y presa a los plaguicidas

Durante las 6 h de exposición previas al inicio de los ensayos de depredación, no se registró mortalidad en las larvas de anfibios y en las anguilas por la exposición a los tres plaguicidas (F, Gly y TFS); poniendo de manifiesto que, para un período de 6 h, la concentración de exposición seleccionada (LOEC) fue subletal tanto para las anguilas como para las nueve especies de larvas de anfibios.

Solamente en renacuajos de *E. bicolor* y *P. albonotatus* expuestos a 2 mg/l de F se observó respuesta tardía a estímulos, natación en reversa y cola arqueada luego de las 6 h de exposición. Por su parte, cuando las anguilas se expusieron a la concentración más alta de F, que corresponde a la LOEC para F de *T. typhoni* (3,12 mg/l), aumentaron levemente su mucosidad corporal y además se observaron con el cuerpo laxo, como si presentaran una ligera distensión muscular (Figura 10). Sin embargo, este comportamiento desapareció al transferir las anguilas a agua libre de plaguicidas, luego de finalizado el período de exposición.



**Figura 10:** Anguilas durante la fase de exposición. A la izquierda, se observa a las anguilas expuestas a agua de clorinada, donde se manifiesta la sinuosidad corporal característica; y a la derecha, expuestas a fenitrothion, donde se las puede observar con una ligera distensión muscular.

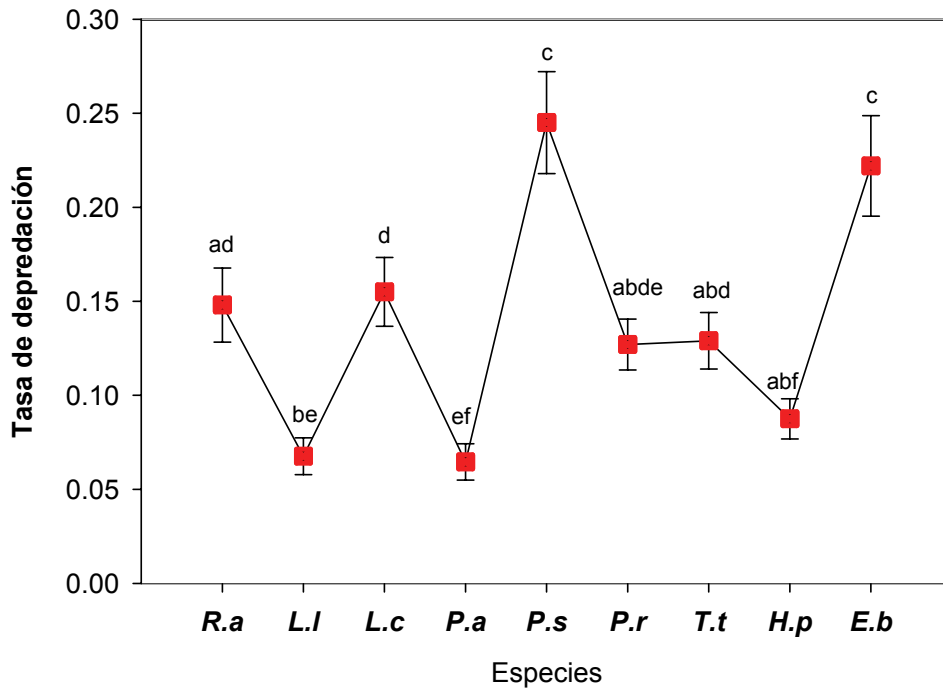
## 4.3. Ensayos de depredación directa

Se realizaron en total 27 ensayos de depredación (Figura 11), incluyendo las nueve especies de larvas de anfibios (*R. arenarum*, *L. latrans*, *L. chaquensis*, *P. albonotatus*, *P. santafecinus*, *P. riograndensis*, *T. typhoni*, *H. pulchellus* y *E. bicolor*) y los tres plaguicidas (F, Gly y TFS), todos por triplicado.

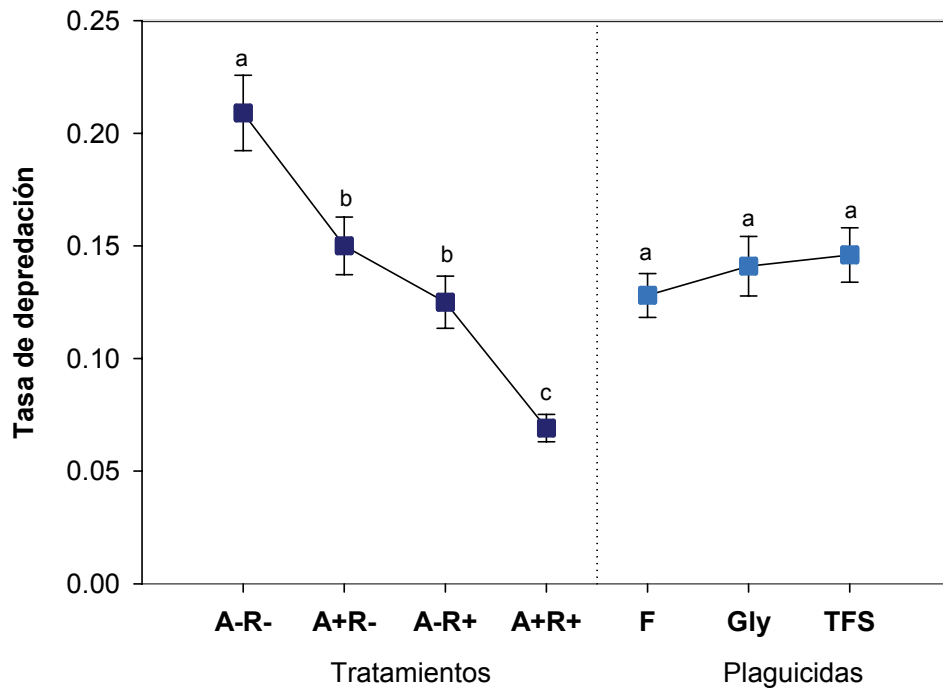


**Figura 11:** Ensayos depredador-presa llevados a cabo en la sala de bioensayos.

A 1 hora, el análisis estadístico mostró una marcada diferencia en la tasa de depredación entre las especies (ANOVA  $F_{8,216} = 19,982$ ;  $p < 0,0001$ ), siendo *P. albonotatus* la especie menos depredada y *P. santafecinus* la que presentó mayor tasa de depredación (Figura 12). Si bien la tasa de depredación no varió significativamente según los plaguicidas (ANOVA  $F_{2,216} = 1,169$ ;  $p = 0,313$ ) (Figura 13), si se observó relación significativa entre la tasa de depredación de las especies con los plaguicidas (ANOVA  $F_{16,216} = 3,266$ ;  $p < 0,0001$ ). Los resultados también mostraron que la tasa de depredación varió entre las diferentes combinaciones de tratamientos (ANOVA  $F_{3,216} = 37,682$ ;  $p < 0,0001$ ). Es así que la tasa de depredación del tratamiento A-R- difirió significativamente con respecto todas las otras combinaciones de tratamientos (A+R-  $p = 0,0001$ ; A-R+ y A+R+,  $p < 0,0001$ , respectivamente), así como también entre A+R- y A+R+ (Tukey  $p < 0,0001$ ) y entre A-R+ y A+R+ (Tukey  $p = 0,0002$ ) (Figura 13). A su vez, se encontró una relación significativa en la tasa de depredación de las especies con respecto a los tratamientos (ANOVA  $F_{24,216} = 1,981$ ;  $p = 0,006$ ) y a los plaguicidas (ANOVA  $F_{6,216} = 2,773$ ;  $p = 0,013$ ), no registrándose interacción entre los tres factores para la tasa de depredación (ANOVA  $F_{48,216} = 1,209$ ;  $p = 0,183$ ).



**Figura 12:** Tasa de depredación sobre las diferentes especies de larvas de anfibios anuros a 1 h. (*R.a* = *Rhinella arenarum*, *L.l* = *Leptodactylus latrans*, *L.c* = *Leptodactylus chaquensis*, *P.a* = *Physalaemus albonotatus*, *P.s* = *Physalaemus santafecinus*, *P.r* = *Physalaemus riograndensis*, *T.t* = *Trachycephalus typhonius*, *H.p* = *Hypsiboas pulchellus*, *E.b* = *Elachistocleis bicolor*). Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre las especies (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

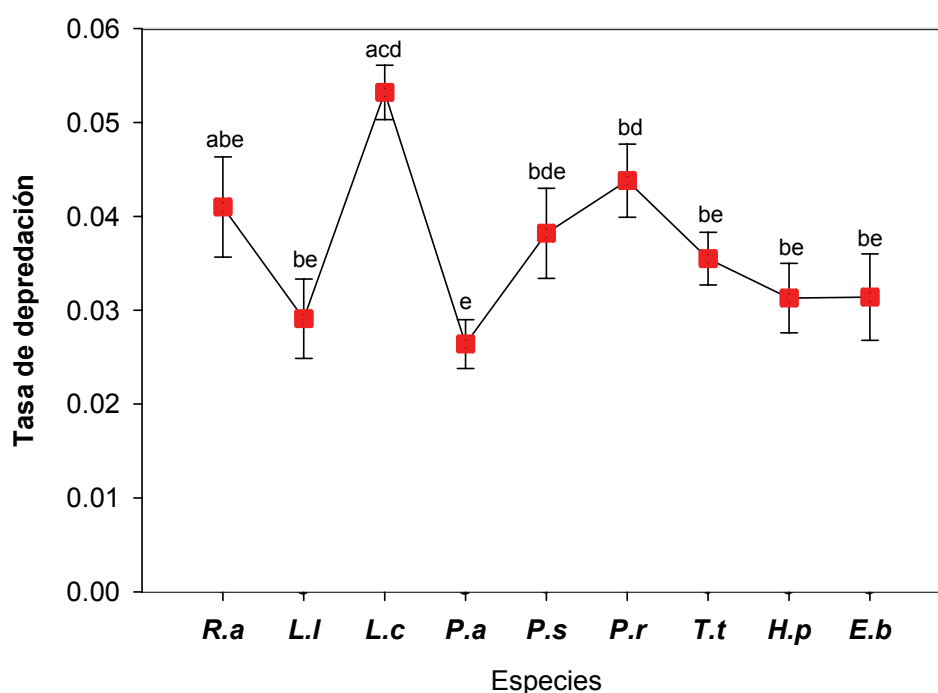


**Figura 13:** Efecto de los diferentes tratamientos y plaguicidas sobre la tasa de depredación de larvas de anfibios a 1 h. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre

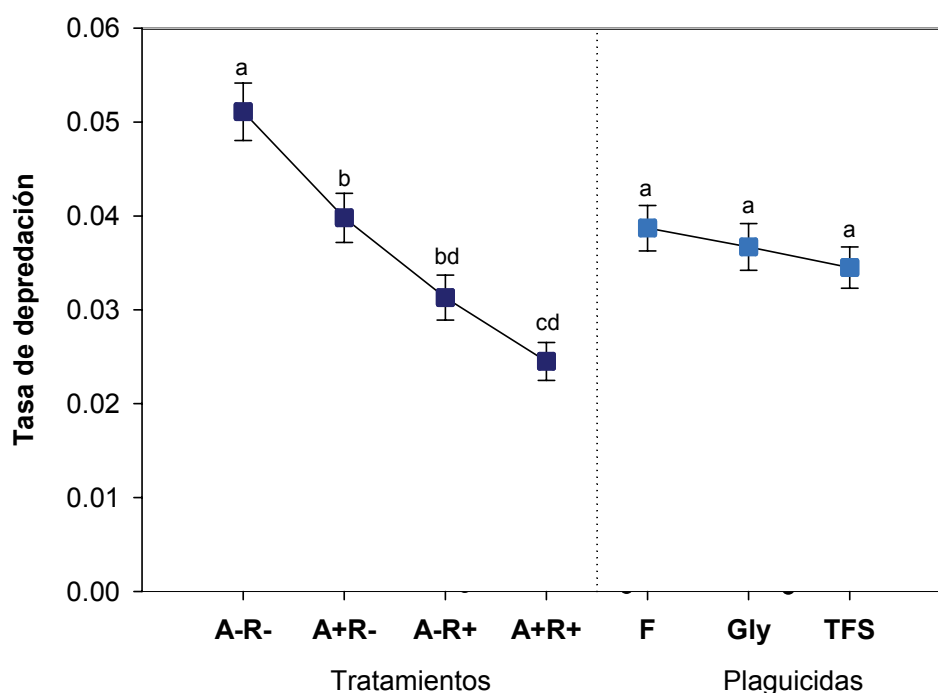
las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tratamientos y entre plaguicidas (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

Para las 6 h, la tasa de depredación de larvas de anfibios varió significativamente entre las especies (ANOVA  $F_{8,216} = 5,625$ ;  $p < 0,0001$ ), siendo nuevamente *P. albonotatus* la especie menos depredada y *L. chaquensis* la que registró mayor depredación (Figura 14). La tasa de depredación no varió significativamente entre los plaguicidas (ANOVA  $F_{2,216} = 1,061$ ;  $p = 0,313$ ) (Figura 15), pero si resultó significativa la interacción de la tasa de depredación de las especies con los plaguicidas (ANOVA  $F_{16,216} = 2,354$ ;  $p = 0,003$ ). A su vez, la tasa de depredación varió entre los diferentes tratamientos (ANOVA  $F_{3,216} = 23,554$ ;  $p < 0,0001$ ), principalmente entre A-R- con respecto a A+R- ( $p = 0,005$ ), a A-R+ ( $p < 0,0001$ ) y a A+R+ ( $p < 0,0001$ ), y entre A+R- y A+R+ ( $p < 0,0001$ ) (Figura 15).

No se observó relación significativa en la tasa de depredación entre especies y tratamientos (ANOVA  $F_{24,216} = 1,256$ ;  $p = 0,197$ ), y entre tratamientos y plaguicidas (ANOVA  $F_{6,216} = 0,951$ ;  $p = 0,460$ ). Tampoco fue significativa la interacción de los tres factores sobre la tasa de depredación (ANOVA  $F_{48,216} = 0,823$ ;  $p = 0,786$ ).



**Figura 14:** Tasa de depredación sobre las diferentes especies de larvas de anfibios anuros a las 6 h. (*R.a* = *Rhinella arenarum*, *L.l* = *Leptodactylus latrans*, *L.c* = *Leptodactylus chaquensis*, *P.a* = *Physalaemus albonotatus*, *P.s* = *Physalaemus santafecinus*, *P.r* = *Physalaemus riograndensis*, *T.t* = *Trachycephalus typhonius*, *H.p* = *Hypsiboas pulchellus*, *E.b* = *Elachistocleis bicolor*). Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre las especies (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



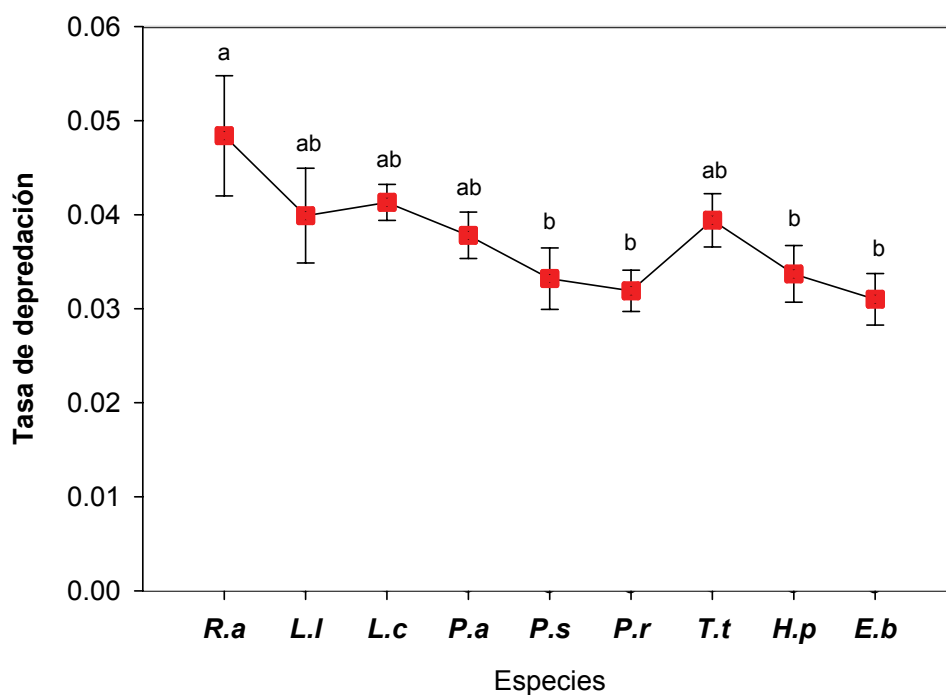
**Figura 15:** Efecto de los diferentes tratamientos y plaguicidas sobre la tasa de depredación de larvas de anfibios a las 6 h. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tratamientos y entre plaguicidas (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

La tasa de depredación a las 18 h fue significativamente diferente entre especies de larvas de anfibios (ANOVA  $F_{8,216} = 4,372$ ;  $p < 0,0001$ ). Como puede observarse en la Figura 16, la especie que recibió mayor depredación fue *R. arenarum*, mientras que *E. bicolor* fue la menos depredada. La tasa de depredación no varió de manera significativa entre plaguicidas (ANOVA  $F_{2,216} = 2,997$ ;  $p = 0,052$ ) (Figura 17), pero si se observó interacción significativa en la tasa de depredación entre especies por plaguicidas (ANOVA  $F_{16,216} = 3,431$ ;  $p < 0,0001$ ). La tasa de depredación varió entre las diferentes combinaciones de tratamientos (ANOVA  $F_{3,216} = 50,890$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 17). La posterior comparación de medias (test de Tukey) permitió detectar diferencias significativas entre el tratamiento donde depredador y presa no fueron expuestos a plaguicidas (A-R-) con respecto a las restantes combinaciones de tratamientos (A+R-, A-R+, A+R+;  $p < 0,0001$ , respectivamente). También, la tasa de depredación difirió entre los tratamientos A+R- y A+R+ ( $p < 0,0001$ ) y entre A-R+ y A+R+ ( $p = 0,001$ ).

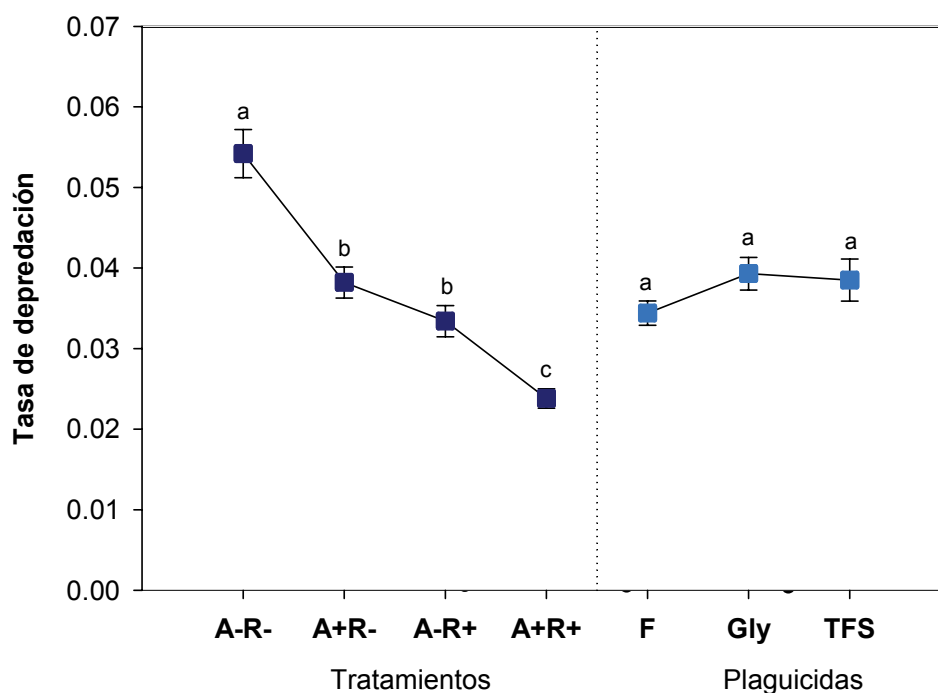
No se observó relación en la tasa de depredación entre especies por tratamientos (ANOVA  $F_{24,216} = 1,438$ ;  $p = 0,092$ ), aunque si fueron significativas las relaciones de la tasa de depredación entre tratamientos con respecto a los plaguicidas (ANOVA  $F_{6,216} = 3,612$ ;  $p =$



0,002) y entre las especies, los tratamientos y los plaguicidas (ANOVA  $F_{48,216} = 1,781$ ;  $p = 0,003$ ).



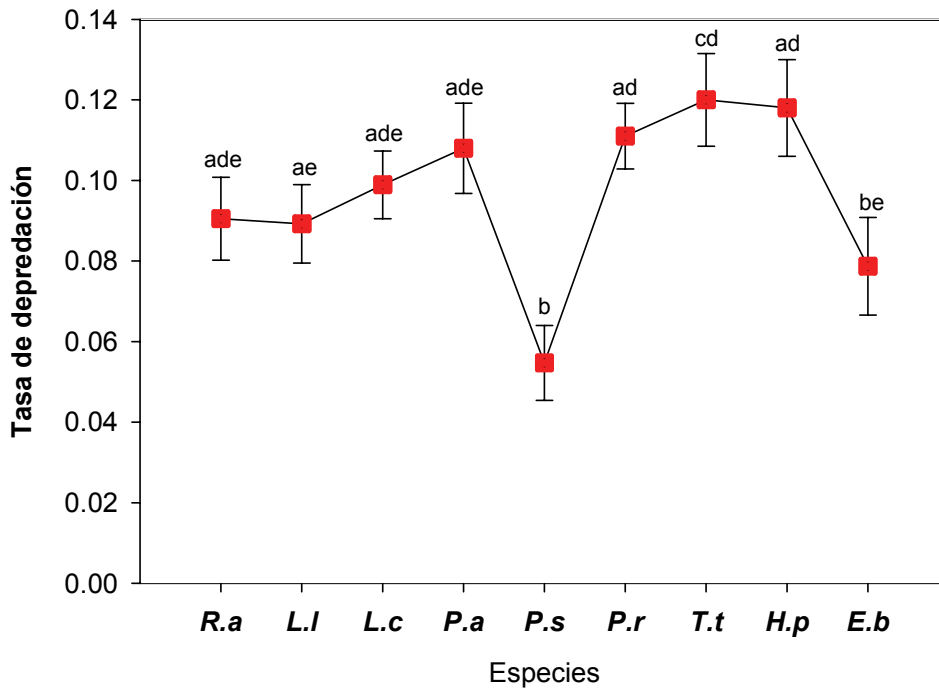
**Figura 16:** Tasa de depredación sobre las diferentes especies de larvas de anfibios anuros a las 18 h. (**R.a** = *Rhinella arenarum*, **L.l** = *Leptodactylus latrans*, **L.c** = *Leptodactylus chaquensis*, **P.a** = *Physalaemus albonotatus*, **P.s** = *Physalaemus santafecinus*, **P.r** = *Physalaemus riograndensis*, **T.t** = *Trachycephalus typhonius*, **H.p** = *Hypsiboas pulchellus*, **E.b** = *Elachistocleis bicolor*). Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre las especies (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



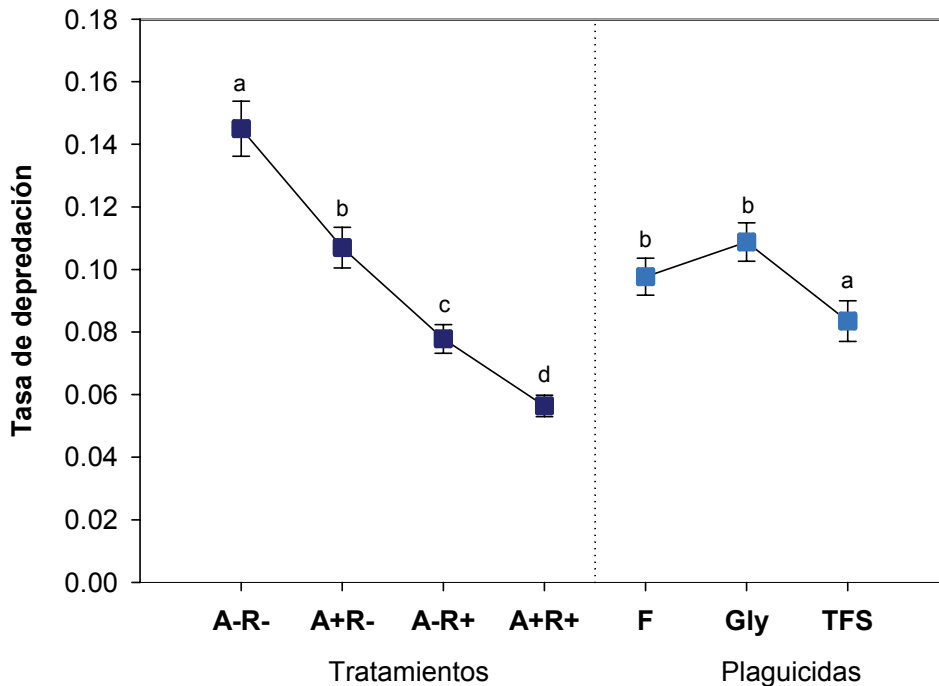
**Figura 17:** Efecto de los diferentes tratamientos y plaguicidas sobre la tasa de depredación de larvas de anfibios a las 18 h. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tratamientos y entre plaguicidas (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

A las 24 h, la tasa de depredación varió significativamente entre las especies (ANOVA  $F_{8,216} = 9,305$ ;  $p < 0,0001$ ), siendo la especie más depredada *T. typhonius* y *P. santafecinus* la menos depredada (Figura 18). También fue significativa la tasa de depredación entre plaguicidas (ANOVA  $F_{2,216} = 10,120$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 19), registrándose menores tasas de depredación cuando los organismos fueron expuestos a TFS. Asimismo, fue significativa la relación de la tasa de depredación entre las especies según los plaguicidas (ANOVA  $F_{16,216} = 10,171$ ;  $p < 0,0001$ ), como también la tasa de depredación entre las distintas combinaciones de tratamientos (ANOVA  $F_{3,216} = 70,265$ ;  $p < 0,0001$ ). La posterior comparación de medias (test de Tukey) indicó que las diferencias fueron significativas entre el tratamiento A-R- con respecto a los restantes tratamientos (A+R-, A-R+, A+R+;  $p < 0,0001$ , respectivamente), y además entre A+R- con respecto a A-R+ y a A+R+ ( $p < 0,0001$ , respectivamente) y finalmente, entre A-R+ y A+R+ ( $p = 0,006$ ) (Figura 19). La única combinación de los factores que presentó relación con la variable tasa de depredación fue la interacción entre las especies y los tratamientos (ANOVA  $F_{24,216} = 2,234$ ;  $p = 0,001$ ). Mientras que las interacciones de la tasa de depredación entre los tratamientos y plaguicidas (ANOVA  $F_{6,216} = 0,705$ ;  $p = 0,646$ ) y entre tratamientos, especies y plaguicidas fueron no significativas (ANOVA  $F_{48,216} = 1,111$ ;  $p = 0,302$ ).





**Figura 18:** Tasa de depredación sobre las diferentes especies de larvas de anfibios anuros a las 24 h. (*R.a* = *Rhinella arenarum*, *L.l* = *Leptodactylus latrans*, *L.c* = *Leptodactylus chaquensis*, *P.a* = *Physalaemus albonotatus*, *P.s* = *Physalaemus santafecinus*, *P.r* = *Physalaemus riograndensis*, *T.t* = *Trachycephalus typhonius*, *H.p* = *Hypsiboas pulchellus*, *E.b* = *Elachistocleis bicolor*). Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre las especies (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

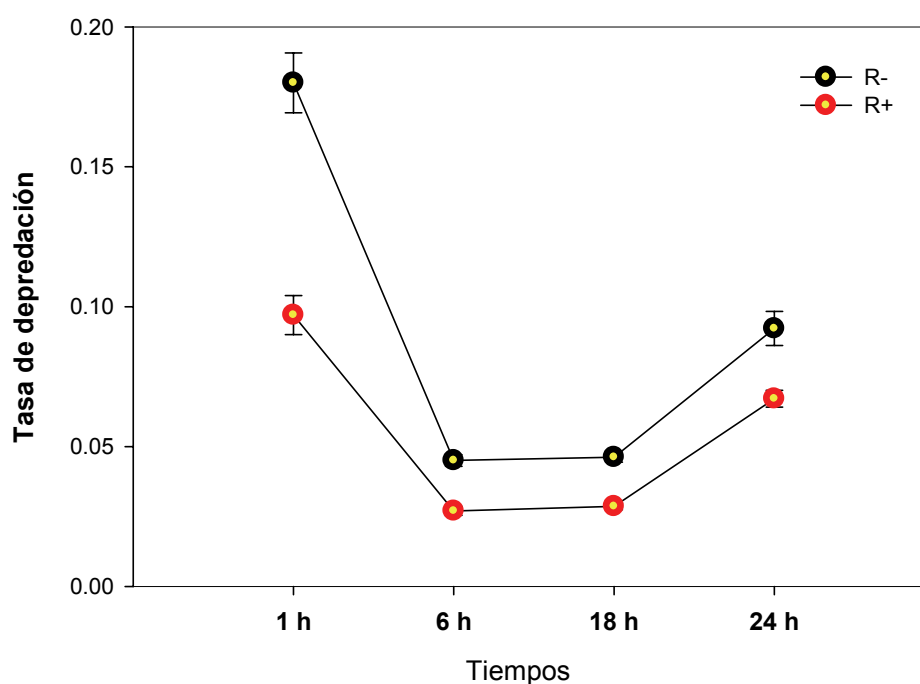


**Figura 19:** Efecto de los diferentes tratamientos y plaguicidas sobre la tasa de depredación de larvas de anfibios a las 24 h. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras

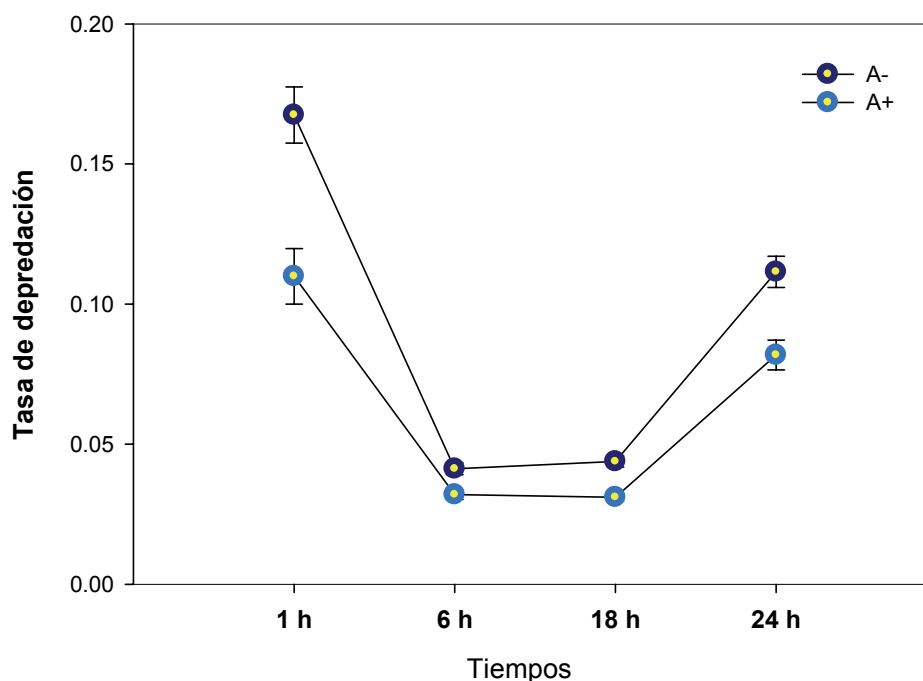
sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tratamientos y entre plaguicidas (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

La depredación sobre renacuajos intoxicados (R+) y no intoxicados (R-) varió a lo largo de los ensayos de depredación (Figura 20). En todos los casos se pudo observar que las anguilas depredaron en mayor cantidad sobre los R- por sobre los R+, siendo significativas las diferencias entre ambos a 1 h ( $t = 6,44$ ; grados de libertad [gl] = 322;  $p < 0,0001$ ), 6 h ( $t = 6,73$ ; gl = 322;  $p < 0,0001$ ), 18 h ( $t = 7,86$ ; gl = 322;  $p < 0,0001$ ) y 24 h ( $t = 3,63$ ; gl = 322;  $p = 0,0003$ ).

Asimismo, también se observó que las anguilas no expuestas a plaguicidas (A-) consumieron más renacuajos que las expuestas (R+) durante los ensayos de depredación (Figura 21), presentando diferencias significativas en la tasa de depredación de A- con respecto a A+ en todos los períodos de tiempo evaluados: 1 h ( $t = 4,35$ ; gl = 322;  $p < 0,0001$ ), 6 h ( $t = 3,30$ ; gl = 322;  $p = 0,0011$ ), 18 h ( $t = 5,47$ ; gl = 322;  $p < 0,0001$ ) y 24 h ( $t = 4,23$ ; gl = 322;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 20:** Renacuajos expuestos (R+) y no expuestos (R-) a los plaguicidas consumidos por las anguilas durante los ensayos de depredación. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar.



**Figura 21:** Tasa de depredación de las anguilas expuestas (A+) y no expuestas (A-) a los plaguicidas durante los ensayos de depredación. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar.

#### 4.4. Monitoreo de los organismos durante los ensayos de depredación

##### 4.4.1. Mortalidad

No se registró mortalidad en las larvas de anfibios (expuestas y no expuestas a los plaguicidas) que fueron monitoreadas en paralelo al desarrollo de los ensayos de depredación, descartando mortalidad natural o mortalidad debido a la exposición a plaguicidas.

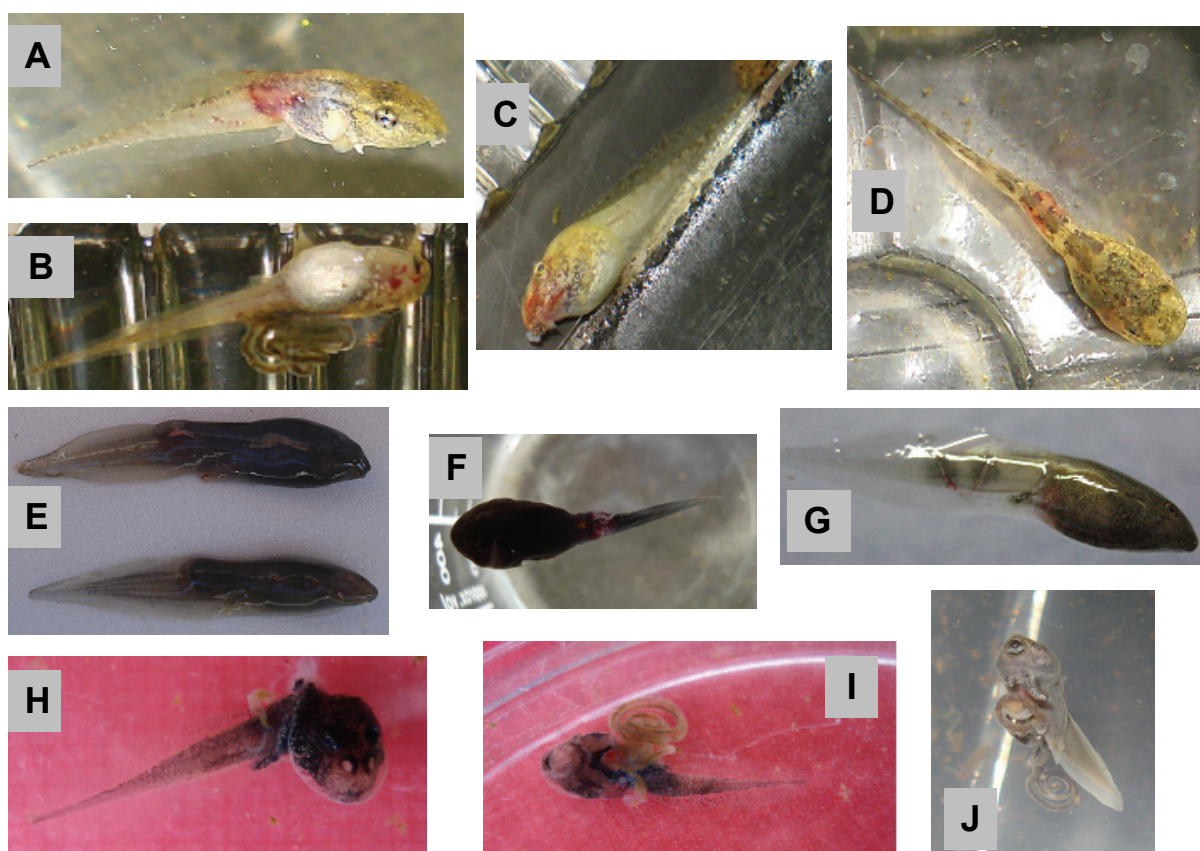
##### 4.4.2. Lesiones

Las lesiones producidas por las anguilas durante los intentos de captura de su presa fueron 1,4% letales y 1,2% subletales. Ambos tipos de lesiones fueron registradas en las siguientes especies: *R. arenarum*, *L. latrans*, *L. chaquensis*, *T. typhoni*, *H. pulchellus* y *E. bicolor*. Sin embargo, ningún tipo de lesión fue observada en las tres especies del género *Physalaemus* (*P. albonotatus*, *P. santafecinus* y *P. riograndensis*).

Las lesiones con efectos letales se localizaron en la región de la cabeza y el cuerpo de las larvas de anfibios (83,5%) (Figura 22-B, C, I y J) y en la intersección del cuerpo con la cola (16,5%) (Figura 22-A, E y H). Este tipo de lesiones fue fácilmente cuantificable, ya que las

larvas se encontraban muertas, y por lo general, con la zona ventral desgarrada. Mientras que las lesiones con efectos subletales se localizaron principalmente en la cola de los renacuajos (72%) (Figura 22-D, F y G). Las manifestaciones más comunes de este tipo de lesiones fueron las mordeduras en la zona caudal, con o sin pérdida parcial de la cola, y en menor frecuencia, las lesiones hemorrágicas internas en la región de la cabeza y el cuerpo de las larvas (11,2%) y en la intersección del cuerpo con la cola (16,8%).

A su vez, la prevalencia de las lesiones letales varió según los distintos tratamientos (A-R-, A+R-, A-R+ y A+R+) ( $X^2 = 13,40$ ; grados de libertad [gl] = 3;  $p = 0,0038$ ), siendo el tratamiento A-R+ el que registró el mayor porcentaje de lesiones (38%), seguido por A+R+ (25,6%), A-R- (20,7%) y A+R- (15,7%). Las lesiones letales también fueron diferentes a lo largo del período de tiempo ensayado ( $X^2 = 24,19$ ; gl = 3;  $p < 0,0001$ ). A 1 h, las lesiones letales producidas por las anguilas alcanzaron el 26,45% y a las 6 h, el 23,97%, observándose el pico máximo a las 18 h (40,5%) y el mínimo a las 24 h (9,09%). Sin embargo, las lesiones subletales no presentaron variación significativa de acuerdo al tratamiento ( $X^2 = 5,67$ ; gl = 3;  $p = 0,1288$ ) y al período de tiempo ensayado ( $X^2 = 5,58$ ; gl = 3;  $p = 0,1296$ ).



**Figura 22:** Lesiones con efectos letales (A, B, C, E, H, I y J) y subletales (D, F y G) observadas en las larvas de anfibios durante los ensayos de depredación. En la imagen, larvas de *Hypsiboas pulchellus* con **A)** lesión hemorrágica en la intersección del cuerpo con la cola; **B)** lesión hemorrágica en la cabeza y desprendimiento intestinal; **C)** lesión hemorrágica en la región anterior a los ojos; **D)** lesión en la cola;

larvas de *Leptodactylus latrans* con **E**) lesiones en la intersección del cuerpo con la cola; **F**) con lesión en la cola con desgarramiento muscular; **G**) larva de *L. chaquensis* con mordedura en la cola; larvas de *Rhinella arenarum* con **H**) lesión en la intersección del cuerpo con la cola; **I-J**) con la zona ventral desgarrada.

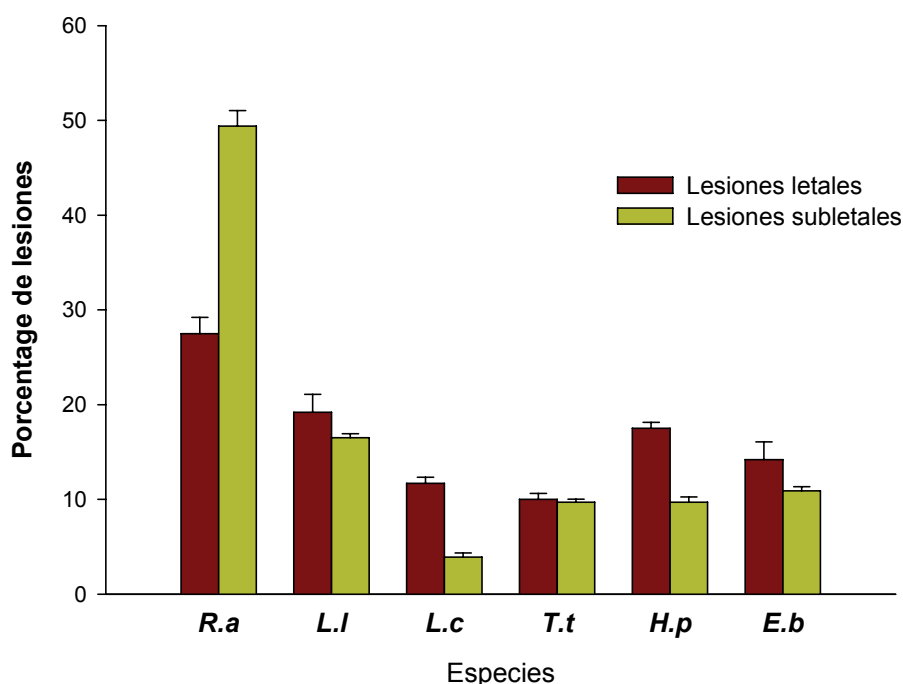
La exposición a plaguicidas no exacerbó la prevalencia de lesiones subletales, ya que éstas se produjeron similarmente sobre R+ y R- ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, las lesiones letales fueron mayormente observadas en R+ ( $X^2 = 9,06$ ; gl = 1;  $p = 0,0026$ ).

La exposición de las anguilas a los plaguicidas tampoco intensificó la prevalencia de lesiones, ya que la mayor parte de las lesiones letales y subletales fueron producidas por A- (58,6% y 58,3%, respectivamente), siendo además no significativas estas diferencias para lesiones letales ( $X^2 = 3,67$ ; gl = 1;  $p = 0,055$ ) y subletales ( $X^2 = 2,68$ ; gl = 1;  $p = 0,101$ ).

Asimismo, tampoco hubo una significancia de lesiones letales ( $X^2 = 4,10$ ; gl = 2;  $p = 0,128$ ) y subletales ( $X^2 = 0,29$ ; gl = 2;  $p = 0,861$ ) debido a la exposición de las larvas de anfibios a uno de los plaguicidas en particular. Si bien las larvas expuestas a F presentaron la mayor cantidad de lesiones (40,8% letales y 35,4% subletales), las diferencias no fueron significativas con respecto a aquellas producidas por Gly (25,8% letales y 33,42% subletales) y TFS (33,3% letales y 31,16% subletales).

Diferencias entre las especies fueron halladas para lesiones letales ( $X^2 = 14,56$ ; gl = 5;  $p = 0,012$ ) y subletales ( $X^2 = 87,86$ ; gl = 5;  $p < 0,001$ ), siendo *R. arenarum* la de mayor prevalencia de lesiones (letales: 27,5%; subletales: 49,4%) seguida por *L. latrans* (letales: 19,2%; subletales: 16,5%), siendo *T. typhoni* la menos atacada letalmente (10%) y *L. chaquensis* la menos lesionada subletalmente (3,9%) (Figura 23).

Por último, vale la pena aclarar que aquellas larvas de anfibios que presentaron lesiones subletales tuvieron muy poca supervivencia luego de transcurridos los ensayos de depredación. Si bien este parámetro no fue evaluado en este trabajo de tesis, se pudo observar que las larvas murieron a los pocos días (24 y 48 h) de ser mantenidas bajo condiciones controladas de laboratorio.

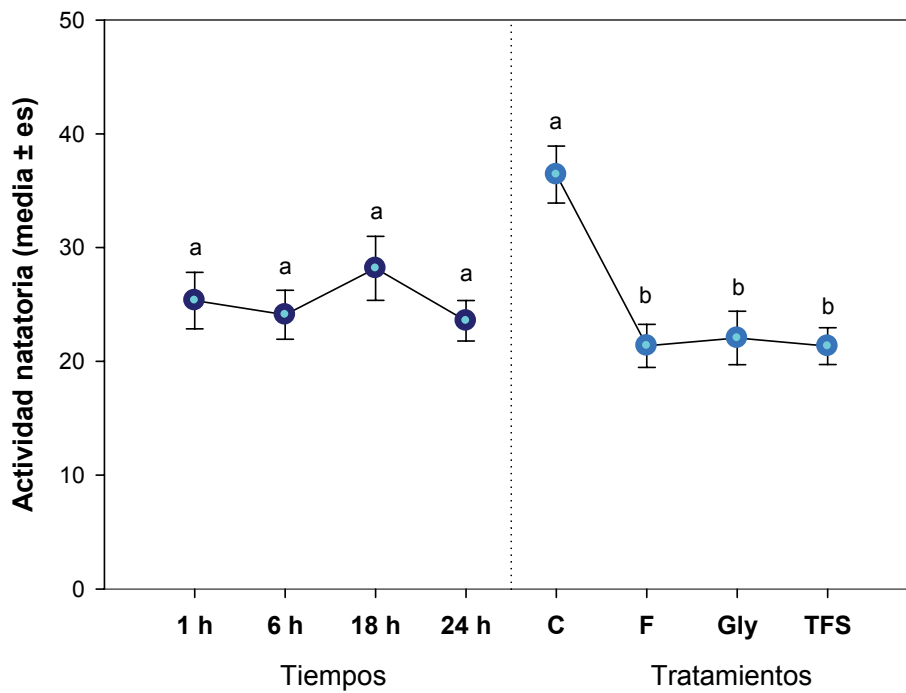


**Figura 23:** Porcentaje de lesiones letales y subletales observadas en larvas de anfibios producidas por las anguilas durante los intentos de captura de sus presas. (*R.a* = *Rhinella arenarum*, *L.l* = *Leptodactylus latrans*, *L.c* = *Leptodactylus chaquensis*, *T.t* = *Trachycephalus typhonius*, *H.p* = *Hypsiboas pulchellus*, *E.b* = *Elachistocleis bicolor*). Las barras sobre las columnas representan el desvío estandar.

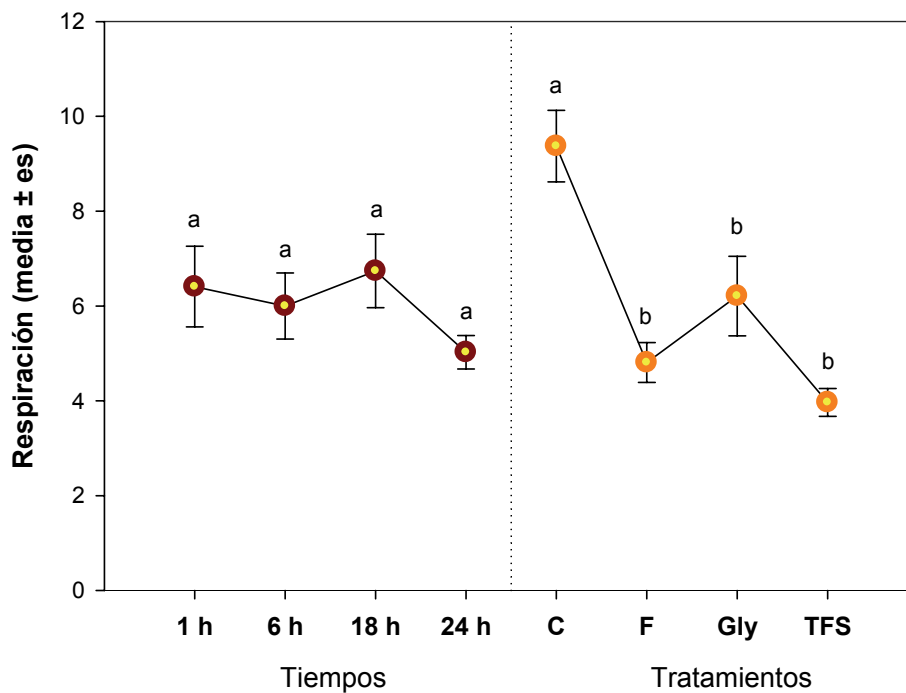
#### 4.5. Evaluación de respuestas etológicas

- *Rhinella arenarum*

El comportamiento de las larvas de *R. arenarum* fue significativamente afectado por la exposición a plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,560$ ;  $F_{6,286} = 16,04$ ;  $p < 0,0001$ ), pero no varió con respecto al tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,972$ ;  $F_{6,286} = 0,679$ ;  $p = 0,667$ ), aunque si fue significativa la interacción de ambos factores (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,464$ ;  $F_{18,286} = 7,42$ ;  $p < 0,0001$ ). Los ANOVAs subsecuentes con su posterior comparación de medias a través del test de Dunnett, indicaron que tanto la actividad natatoria (ANOVA  $F_{3,144} = 11,097$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 24) como la respiración (ANOVA  $F_{3,144} = 15,296$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 25) fueron afectadas por la exposición a los tres plaguicidas ( $p < 0,0001$ , respectivamente). Asimismo, la interacción del tiempo y la exposición a los plaguicidas fue significativa para las variables actividad natatoria (ANOVA  $F_{9,144} = 3,848$ ;  $p = 0,0002$ ) y respiración (ANOVA  $F_{9,144} = 9,596$ ;  $p < 0,001$ ).



**Figura 24:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de *Rhinella arenarum*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



**Figura 25:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de *Rhinella arenarum*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las

barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

A su vez, la actividad natatoria de *R. arenarum* se correlacionó positivamente con la respiración para los tres plaguicidas (Tabla 4).

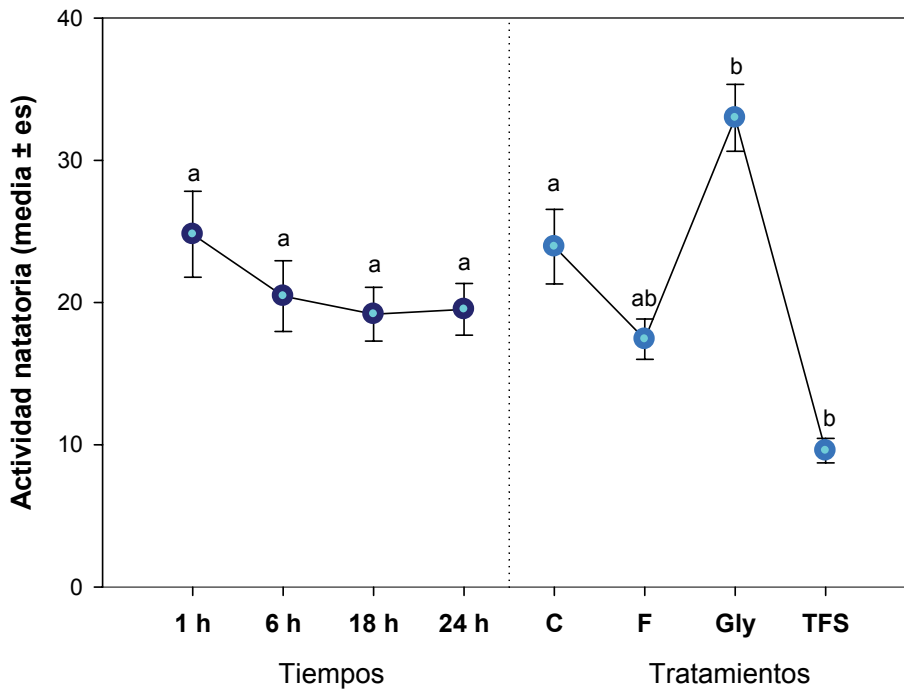
**Tabla 4:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Rhinella arenarum* para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.

	F	Gly	TFS
$r_p$	0,870	0,910	0,886
$p$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$R^2$	0,756	0,828	0,784

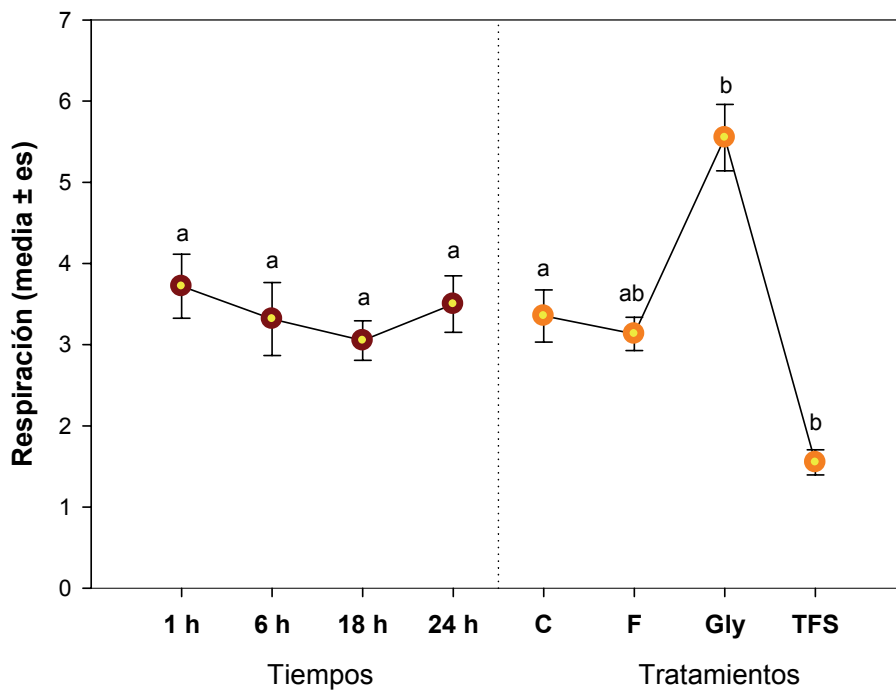
- *Leptodactylus latrans*

Los análisis estadísticos indicaron que existen diferencias significativas en el comportamiento de *L. latrans* debido a la exposición a plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,517$ ;  $F_{6,286} = 18,60$ ;  $p < 0,0001$ ), pero no debido al tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,960$ ;  $F_{6,286} = 0,973$ ;  $p = 0,444$ ) (Figuras 26 y 27), aunque si resultó significativa la interacción de ambos factores (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,747$ ;  $F_{18,286} = 2,496$ ;  $p = 0,001$ ). Los ANOVAs con su posterior comparación de medias a través del test de Dunnett, indicaron que los plaguicidas Gly y TFS modificaron la actividad natatoria (ANOVA  $F_{3,144} = 30,664$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 26) y la respiración (ANOVA  $F_{3,144} = 28,401$ ;  $p < 0,0001$ ) de las larvas de *L. latrans* (Figura 27). Por su parte, la interacción de los dos factores fue significativa únicamente para la respiración (ANOVA  $F_{9,144} = 3,963$ ;  $p = 0,0001$ ).





**Figura 26:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natoria de las larvas de *Leptodactylus latrans*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



**Figura 27:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de *Leptodactylus latrans*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

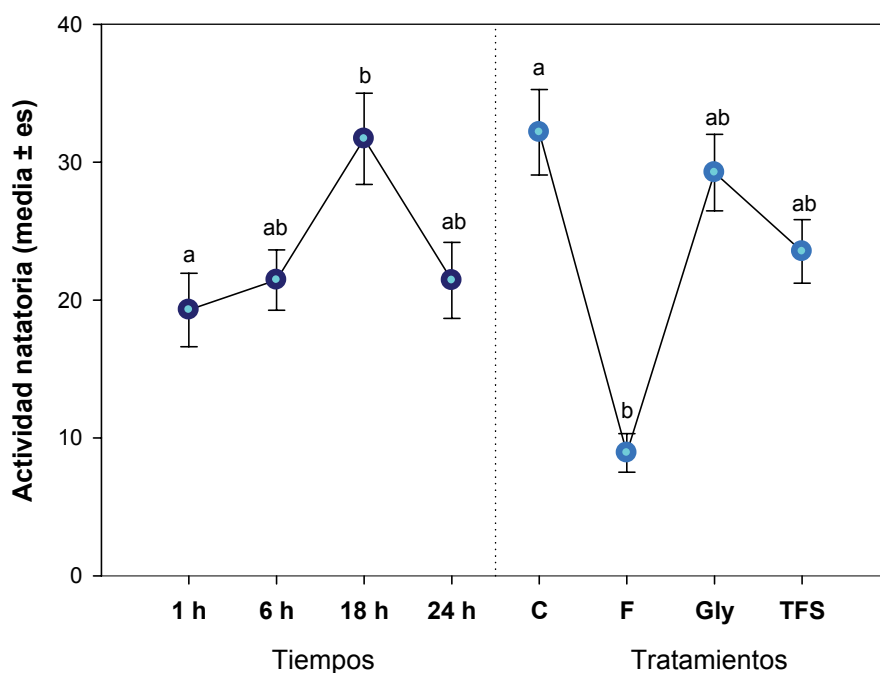
La actividad natatoria de *L. latrans* se correlacionó positivamente con la respiración para los tres plaguicidas (Tabla 5).

**Tabla 5:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Leptodactylus latrans* para los plaguicidas fenitroton (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.

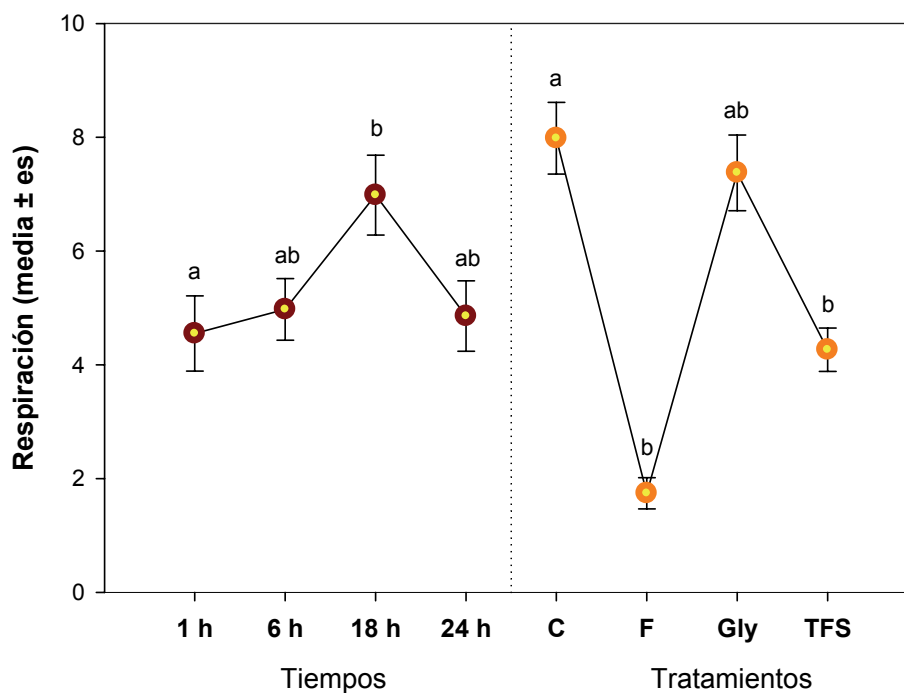
	F	Gly	TFS
$r_p$	0,653	0,686	0,790
$p$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$R^2$	0,426	0,470	0,624

- *Leptodactylus chaquensis*

El comportamiento de las larvas de *L. chaquensis* fue significativamente afectado por los tiempos evaluados (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,842$ ;  $F_{6,286} = 4,27$ ;  $p = 0,0003$ ), la exposición a los plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,471$ ;  $F_{6,286} = 21,76$ ;  $p < 0,0001$ ) y la interacción de los dos factores (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,789$ ;  $F_{18,286} = 1,99$ ;  $p = 0,010$ ). El ANOVA realizado para determinar el efecto del tiempo (ANOVA  $F_{3,144} = 41,532$ ;  $p < 0,0001$ ) mostró diferencias entre 1 h y 18 h para la actividad natatoria (Tukey  $p = 0,007$ ) (Figura 28) y la respiración (Tukey  $p = 0,010$ ) (Figura 29). La exposición a F (Dunnett  $p < 0,0001$ ) provocó una significativa reducción en la actividad natatoria de las larvas de *L. chaquensis* (ANOVA  $F_{3,144} = 24,107$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 28), mientras que para la respiración (ANOVA  $F_{3,144} = 38,083$ ;  $p < 0,0001$ ) los cambios fueron provocados por F y TFS (Dunnett  $p < 0,0001$ , respectivamente) (Figura 29). También, fue significativa la interacción de los dos factores (tiempo y plaguicidas) tanto para la actividad natatoria (ANOVA  $F_{9,144} = 2,864$ ;  $p = 0,004$ ) como para la respiración (ANOVA  $F_{9,144} = 2,708$ ;  $p = 0,006$ ).



**Figura 28:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de *Leptodactylus chaquensis*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



**Figura 29:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de *Leptodactylus chaquensis*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las

barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

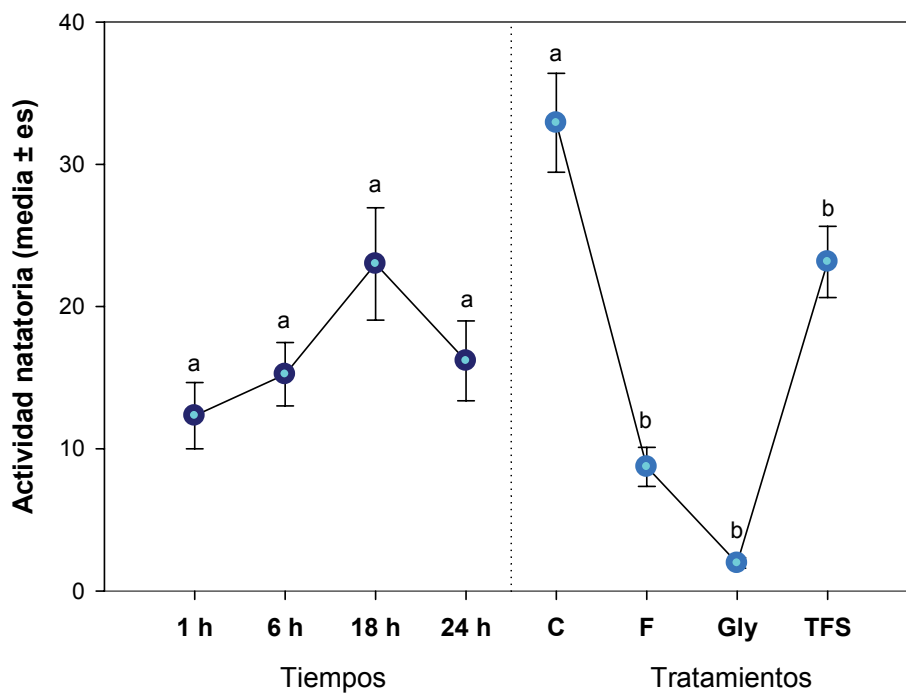
La actividad natatoria de *L. chaquensis* se correlacionó positivamente con la respiración para los tres plaguicidas (Tabla 6).

**Tabla 6:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Leptodactylus chaquensis* para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.

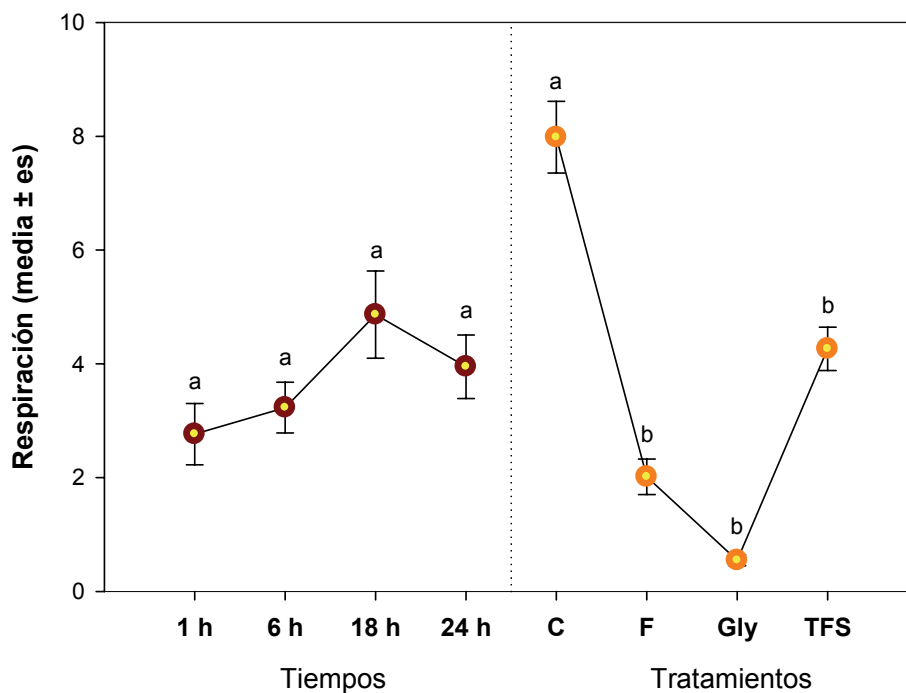
	F	Gly	TFS
$r_p$	0,853	0,708	0,707
$p$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$R^2$	0,727	0,501	0,499

- *Physalaemus albonotatus*

Las larvas de *P. albonotatus* alteraron su comportamiento en función el tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,859$ ;  $F_{6,286} = 3,77$ ;  $p = 0,001$ ) y la exposición a los plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,252$ ;  $F_{6,286} = 47,22$ ;  $p < 0,0001$ ), siendo también significativa la interacción de ambos factores (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,745$ ;  $F_{18,286} = 1,99$ ;  $p = 0,001$ ). Sin embargo, el efecto del tiempo no se reflejó en el análisis de los factores individuales, ya que no fue significativo para la actividad natatoria (ANOVA  $F_{3,144} = 2,407$ ;  $p = 0,069$ ) (Figura 30) y la respiración (ANOVA  $F_{3,144} = 1,838$ ;  $p = 0,142$ ) (Figura 31). Mientras que la exposición a los tres plaguicidas (F, Gly y TFS) alteró en las larvas la actividad natatoria (ANOVA  $F_{3,144} = 70,829$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 30) y la respiración (ANOVA  $F_{3,144} = 86,313$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 31). También se pudo observar que la interacción del tiempo y la exposición a los plaguicidas resultó significativa para la actividad natatoria (ANOVA  $F_{9,144} = 3,780$ ;  $p = 0,0002$ ) y la respiración (ANOVA  $F_{9,144} = 3,397$ ;  $p = 0,001$ ).



**Figura 30:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de *Physalaemus albonotatus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



**Figura 31:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de *Physalaemus albonotatus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las

barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

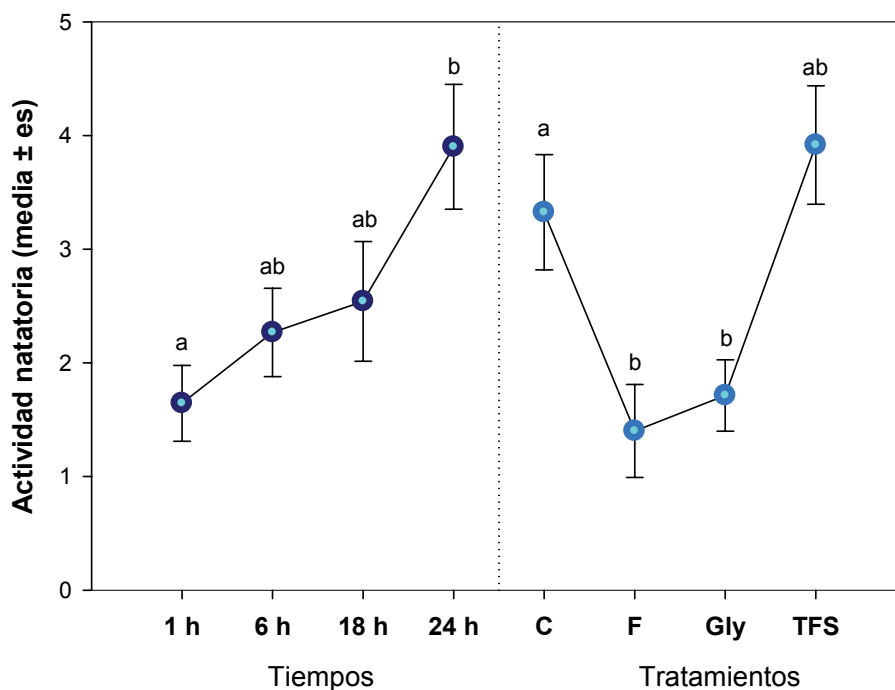
Asimismo, la actividad natatoria de *P. albonotatus* se correlacionó positivamente con la respiración para los tres plaguicidas (Tabla 7).

**Tabla 7:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Physalaemus albonotatus* para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.

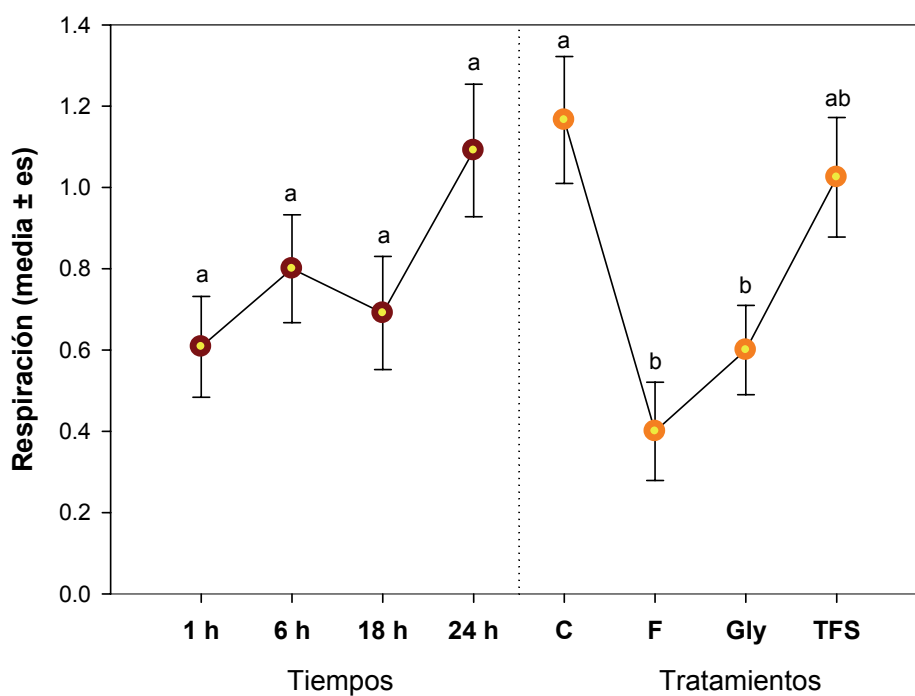
	F	Gly	TFS
$r_p$	0,688	0,742	0,514
$p$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$R^2$	0,473	0,550	0,264

- ***Physalaemus santafecinus***

El tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,894$ ;  $F_{6,286} = 2,73$ ;  $p = 0,013$ ), la exposición a los plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,768$ ;  $F_{6,286} = 6,727$ ;  $p < 0,0001$ ) y la interacción de ambos factores (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,789$ ;  $F_{18,286} = 1,99$ ;  $p = 0,01$ ) influyeron sobre el comportamiento de las larvas de *P. santafecinus*. La actividad natatoria (ANOVA  $F_{3,144} = 4,875$ ;  $p = 0,003$ ) presentó diferencias significativas a 1 h con respecto a las 24 h ( $p = 0,001$ ; Figura 32), mientras que la respiración no fue influida por el tiempo (ANOVA  $F_{3,144} = 2,376$ ;  $p = 0,072$ ) (Figura 33). Por su parte, F y Gly fueron los plaguicidas que modificaron la actividad natatoria (ANOVA  $F_{3,144} = 11,163$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 32) y la respiración (ANOVA  $F_{3,144} = 10,091$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 33) de las larvas. Además, la interacción tiempo y plaguicidas fue significativa ( $p = 0,001$ ) para ambas variables (actividad: ANOVA  $F_{9,144} = 3,380$ ; respiración: ANOVA  $F_{9,144} = 3,250$ ).



**Figura 32:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de *Physalaemus santafecinus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



**Figura 33:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de *Physalaemus santafecinus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

A su vez, la actividad natatoria de *P. santafecinus* se correlacionó positivamente con la respiración para los tres plaguicidas (Tabla 8).

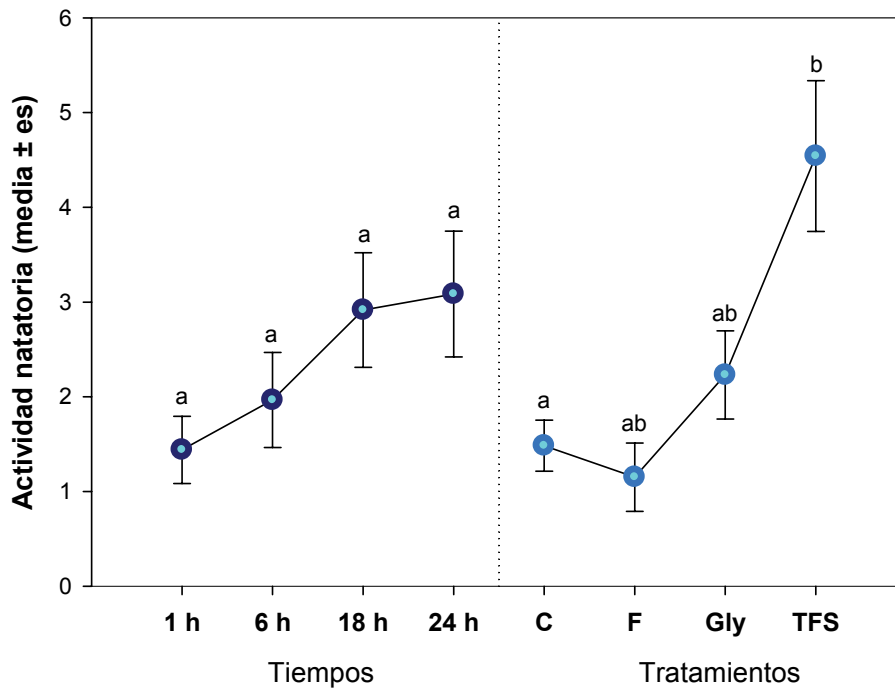
**Tabla 8:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Physalaemus santafecinus* para los plaguicidas fenitroton (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.

	<b>F</b>	<b>Gly</b>	<b>TFS</b>
$r_p$	0,779	0,697	0,814
$p$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$R^2$	0,606	0,485	0,662

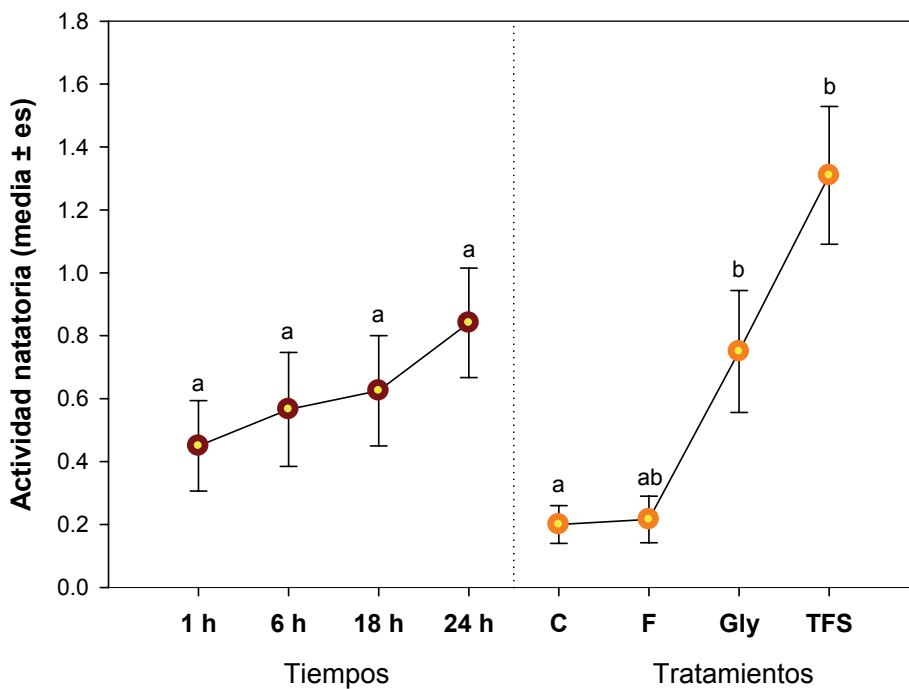
- *Physalaemus riograndensis*

Para *P. riograndensis*, el comportamiento de las larvas no se modificó significativamente con respecto al tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,924$ ;  $F_{6,286} = 1,915$ ;  $p = 0,078$ ) (Figuras 34 y 35), pero si debido a la exposición a los plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,772$ ;  $F_{6,286} = 6,584$ ;  $p < 0,00001$ ). Los cambios en la actividad natatoria (ANOVA  $F_{3,144} = 6,177$ ;  $p = 0,001$ ) y en la respiración (ANOVA  $F_{3,144} = 11,614$ ;  $p < 0,0001$ ) fueron provocados por la exposición al plaguicida TFS (Dunnett  $p = 0,008$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente) (Figuras 34 y 35). Asimismo, la interacción entre el tiempo y la exposición a los plaguicidas fue significativa sobre el comportamiento (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,774$ ;  $F_{18,286} = 2,175$ ;  $p = 0,004$ ), afectando tanto a la actividad natatoria (ANOVA  $F_{9,144} = 2,645$ ;  $p = 0,007$ ) como a la respiración de las larvas (ANOVA  $F_{9,144} = 2,696$ ;  $p = 0,0062$ ).





**Figura 34:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de *Physalaemus riograndensis*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



**Figura 35:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de *Physalaemus riograndensis*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

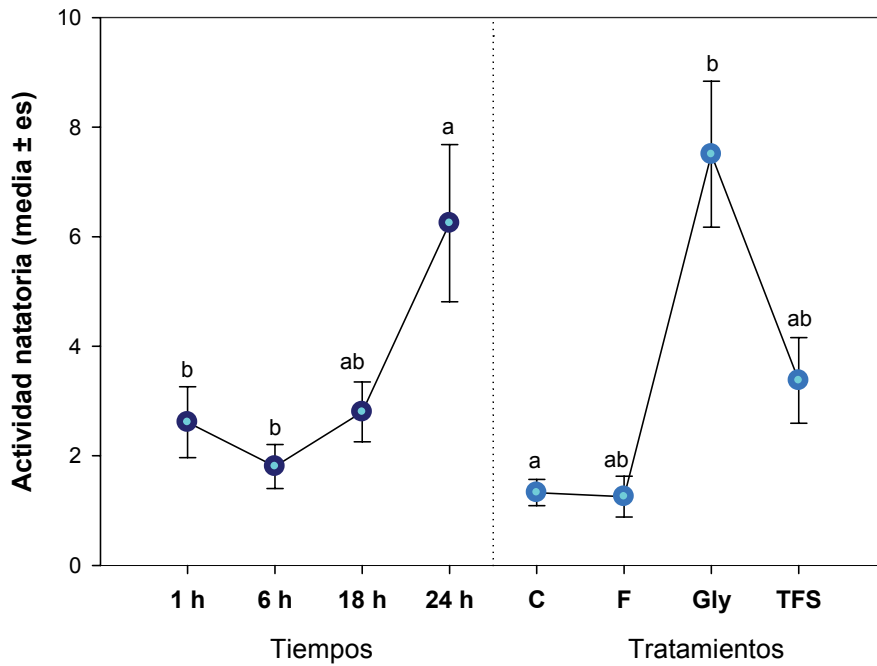
Como se puede observar en la Tabla 9, la actividad natatoria de *P. riograndensis* se correlacionó positivamente con la respiración para los tres plaguicidas.

**Tabla 9:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Physalaemus riograndensis* para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.

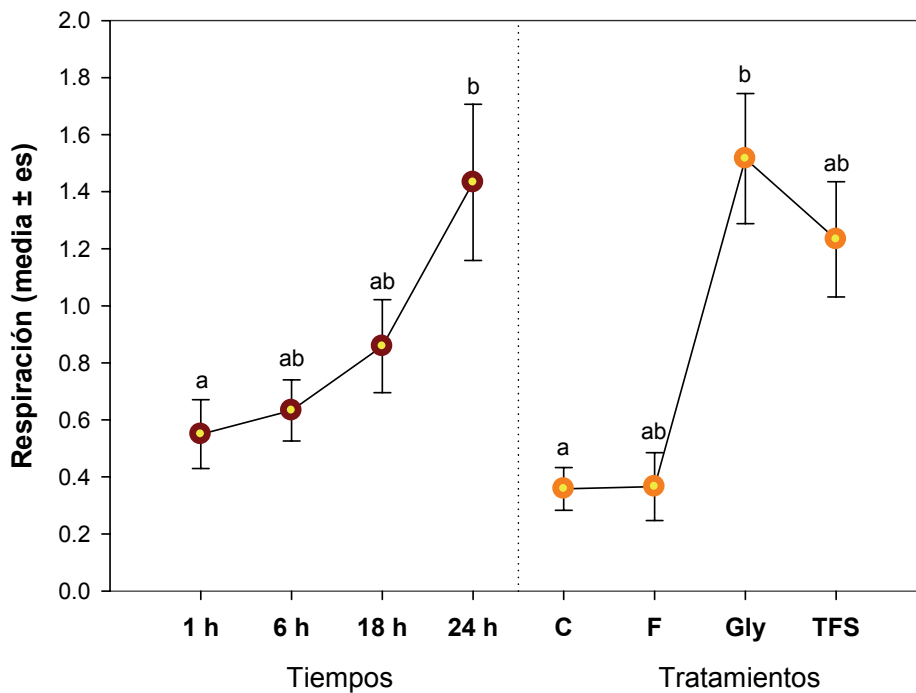
	F	Gly	TFS
$r_p$	0,577	0,785	0,740
$p$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$R^2$	0,332	0,616	0,547

- *Trachycephalus typhonius*

El comportamiento de las larvas varió en función del tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,886$ ;  $F_{6,286} = 2,964$ ;  $p = 0,008$ ) y de la exposición a plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,659$ ;  $F_{6,286} = 11,060$ ;  $p < 0,00001$ ). Los ANOVAs subsecuentes con su posterior comparación de medias, indicaron que la actividad natatoria varió significativamente (ANOVA  $F_{3,144} = 5,502$ ;  $p = 0,001$ ) a las 24 h con respecto a 1 h (Tukey  $p = 0,01$ ) y a 6 h (Tukey  $p = 0,001$ ) (Figura 36), y que además resultó fuertemente modificada por la exposición a Gly (Dunnett  $p < 0,0001$ ; Figura 36) (ANOVA  $F_{3,144} = 17,197$ ;  $p < 0,0001$ ). La respiración también presentó variación significativa entre 1h y 24 h (Tukey  $p = 0,026$ ) (ANOVA  $F_{3,144} = 3,046$ ;  $p = 0,031$ ) como consecuencia de la exposición a Gly (Dunnett  $p < 0,0001$ ) y a TFS (Dunnett  $p = 0,0003$ ) (ANOVA  $F_{3,144} = 15,532$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 37). Por último, el comportamiento de las larvas de *T. typhonius* no presentó relación entre el tiempo y la exposición a los plaguicidas, resultando esta interacción no significativa (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,826$ ;  $F_{18,286} = 1,590$ ;  $p = 0,60$ ).



**Figura 36:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de *Trachycephalus typhonius*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



**Figura 37:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de *Trachycephalus typhonius*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

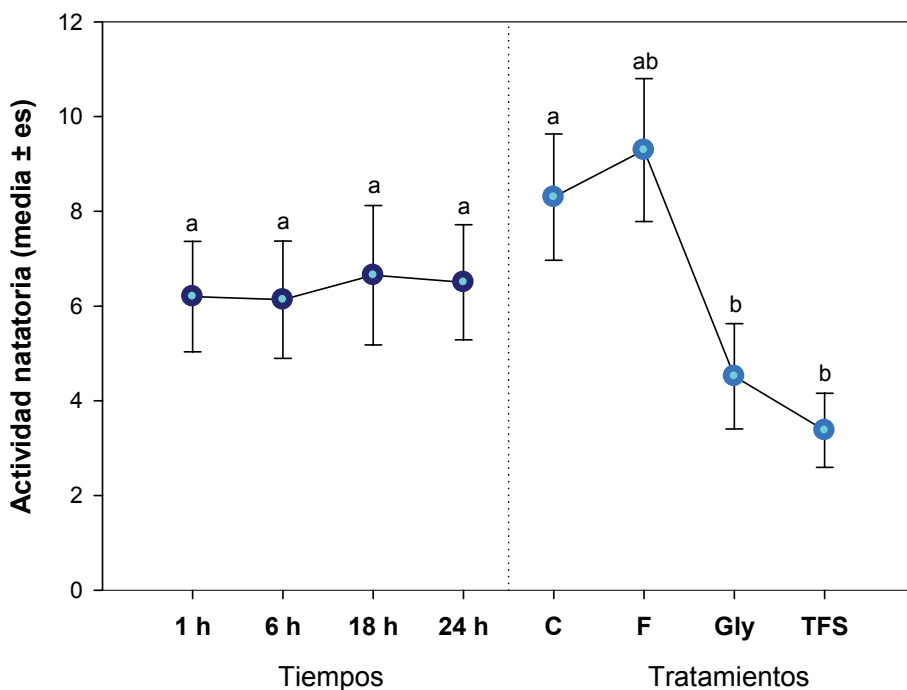
Asimismo, la actividad natatoria de *T. typhonus* se correlacionó positivamente con la respiración para los tres plaguicidas (Tabla 10).

**Tabla 10:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Trachycephalus typhonus* para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.

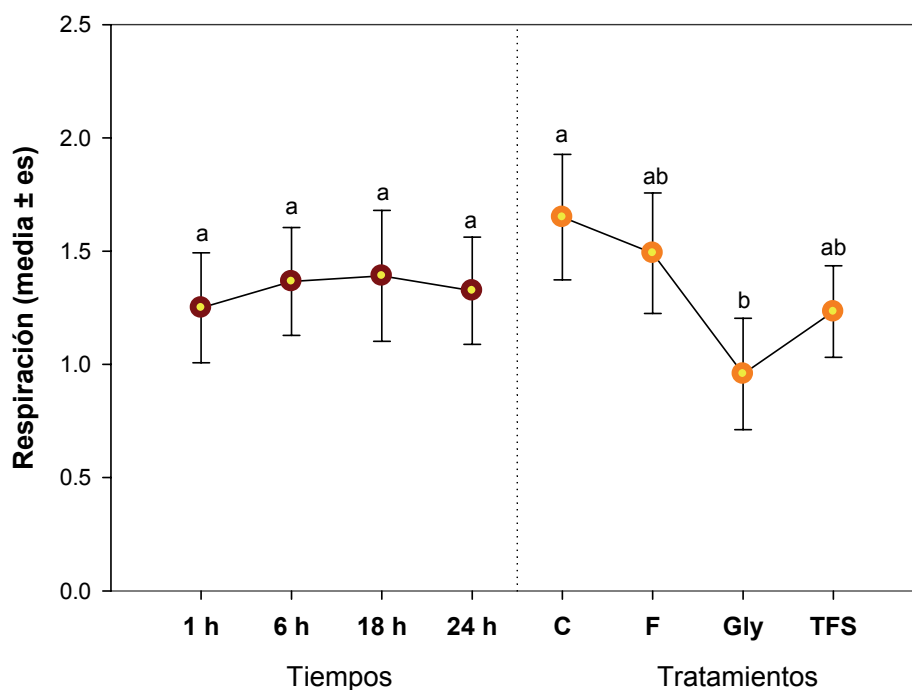
	F	Gly	TFS
$r_p$	0,551	0,716	0,748
$p$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$R^2$	0,303	0,512	0,559

- *Hypsiboas pulchellus*

El comportamiento de las larvas de *H. pulchellus* no varió en cuanto al tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,987$ ;  $F_{6,286} = 0,311$ ;  $p = 0,931$ ) (Figuras 38 y 39), pero si fue afectado por la exposición a los plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,753$ ;  $F_{6,286} = 7,260$ ;  $p < 0,0001$ ). En este sentido, la variación en la actividad natatoria (ANOVA  $F_{3,144} = 7,475$ ;  $p = 0,00019$ ) fue producida por la exposición a Gly (Dunnett  $p = 0,005$ ) y a TFS (Dunnett  $p = 0,001$ ; Figura 38), mientras que la variación en la respiración (ANOVA  $F_{3,144} = 2,772$ ;  $p = 0,044$ ) fue producto de la exposición a Gly (Dunnett  $p = 0,0018$ ; Figura 39). El comportamiento de las larvas de *H. pulchellus* presentó relación entre el tiempo y la exposición a los plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,764$ ;  $F_{18,286} = 2,290$ ;  $p = 0,002$ ), resultando esta interacción significativa para la actividad natatoria (ANOVA  $F_{9,144} = 3,647$ ;  $p = 0,00039$ ) y la respiración (ANOVA  $F_{9,144} = 3,673$ ;  $p = 0,00036$ ).



**Figura 38:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de *Hypsiboas pulchellus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



**Figura 39:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de *Hypsiboas pulchellus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

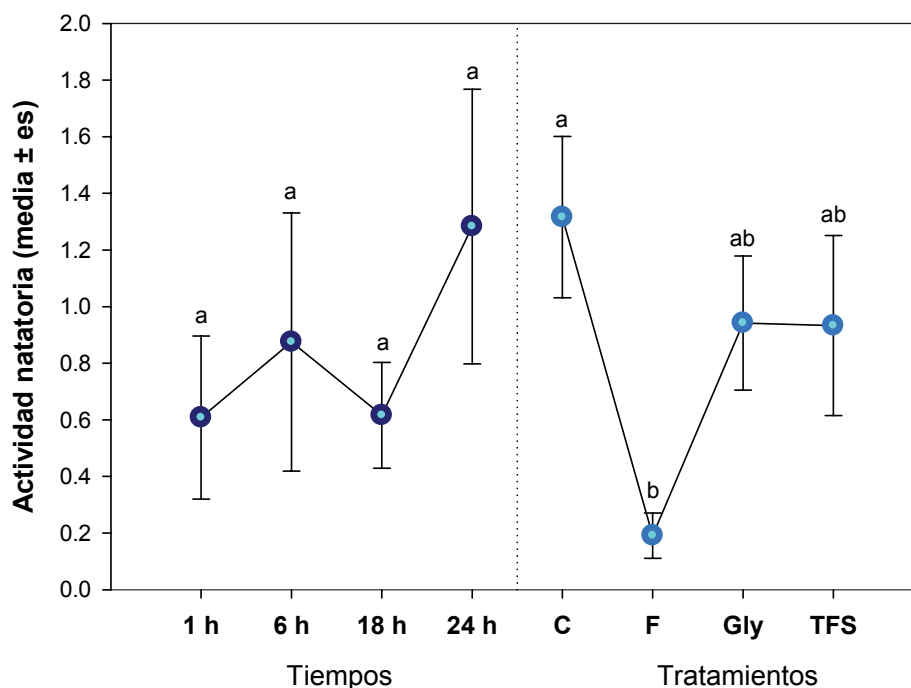
En la Tabla 11, se puede observar cómo la actividad natatoria de *H. pulchellus* se correlacionó positivamente con la respiración para los tres plaguicidas.

**Tabla 11:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Hypsiboas pulchellus* para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.

	F	Gly	TFS
$r_p$	0,905	0,895	0,808
$p$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$R^2$	0,819	0,801	0,652

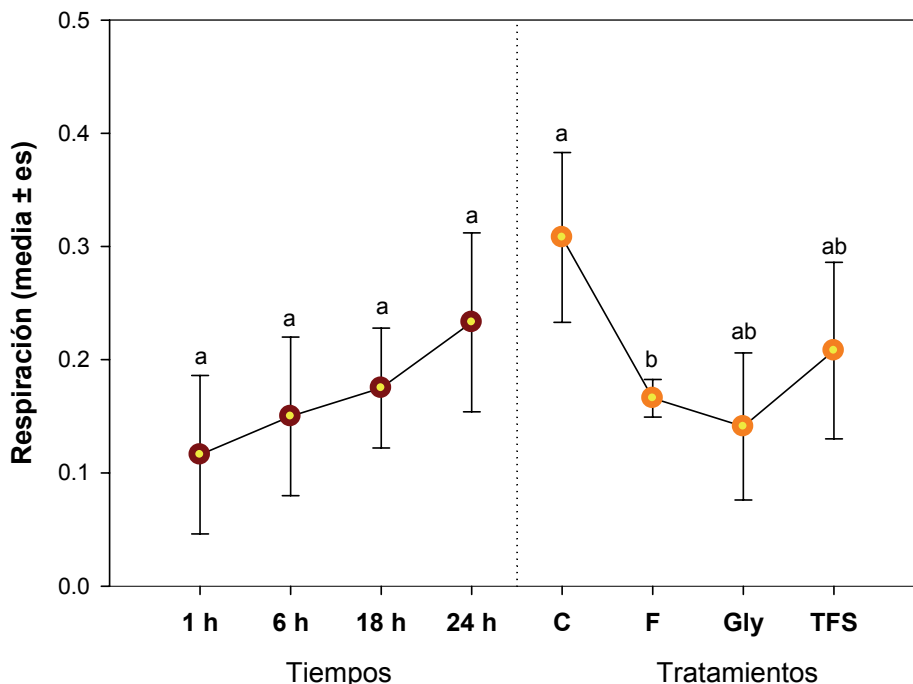
• *Elachistocleis bicolor*

Los análisis estadísticos demostraron de las larvas de *E. bicolor* fueron afectadas en su comportamiento por la exposición a plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,907$ ;  $F_{6,286} = 2,371$ ;  $p = 0,030$ ), principalmente debido al efecto del F sobre la actividad natatoria (Dunnett  $p = 0,038$ ; Figura 40) (ANOVA  $F_{3,144} = 4,136$ ;  $p = 0,045$ ) y la respiración (Dunnett  $p = 0,002$ ; Figura 41) (ANOVA  $F_{3,144} = 5,136$ ;  $p = 0,007$ ). Por su parte, el comportamiento no varió en función del tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,959$ ;  $F_{18,286} = 1,996$ ;  $p = 0,428$ ) (Figura 40 y 41), y tampoco se observó relación del comportamiento con el tiempo y la exposición a los plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,764$ ;  $F_{18,286} = 2,090$ ;  $p = 0,415$ ).



**Figura 40:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad natatoria de las larvas de *Elachistocleis bicolor*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras

sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



**Figura 41:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la respiración de las larvas de *Elachistocleis bicolor*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

A su vez, se puede observar en la Tabla 12 que la actividad natatoria de *E. bicolor* se correlacionó positivamente con la respiración para los tres plaguicidas.

**Tabla 12:** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r_p$ ) entre la actividad natatoria y la respiración de *Elachistocleis bicolor* para los plaguicidas fenitrotion (F), glifosato (Gly) y trifloxistrobin (TFS). N = 80.

	F	Gly	TFS
$r_p$	0,801	0,846	0,837
$p$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$R^2$	0,641	0,715	0,700

#### 4.6. Evaluación de respuestas metabólicas

##### 4.6.1. Larvas de anfibios

A modo de caracterización inicial, se informan los valores medios observados en tejido de larvas de anfibios del tratamiento control considerados como niveles enzimáticos basales de cada especie.

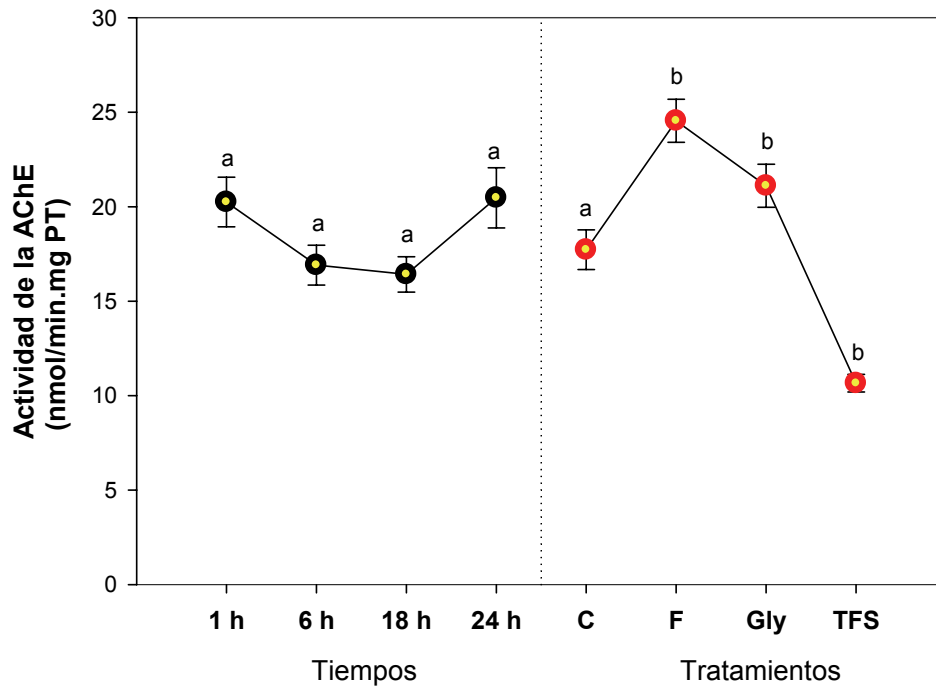
La actividad basal de la enzima AChE expresada como nmol/min.mg PT, presentó los mayores valores (media  $\pm$  es) para *E. bicolor* ( $99,54 \pm 4,13$ ), seguida en orden de magnitud por *H. pulchellus* ( $91,45 \pm 5,11$ ), *P. riograndensis* ( $78,81 \pm 3,04$ ), *P. albonotatus* ( $65,07 \pm 1,59$ ), *L. latrans* ( $35,23 \pm 1,12$ ), *T. typhoni* ( $31,80 \pm 1,09$ ), *P. santafecinus* ( $28,38 \pm 1,30$ ), *L. chaquensis* ( $20,59 \pm 1,13$ ) y *R. arenarum* ( $16,75 \pm 0,92$ ). Por su parte, los niveles más altos de BChE (nmol/min.mg PT) en tejidos de larvas control también se registraron para *E. bicolor* ( $19,31 \pm 0,79$ ), seguidos en orden de magnitud por *H. pulchellus* ( $13,84 \pm 0,98$ ), *P. riograndensis* ( $7,12 \pm 0,46$ ), *P. albonotatus* ( $6,15 \pm 0,32$ ), *L. latrans* ( $6,03 \pm 0,24$ ), *T. typhoni* ( $3,30 \pm 0,22$ ), *R. arenarum* ( $2,62 \pm 0,17$ ), *L. chaquensis* ( $2,57 \pm 0,16$ ) y *P. santafecinus* ( $2,44 \pm 0,12$ ).

- ***Rhinella arenarum***

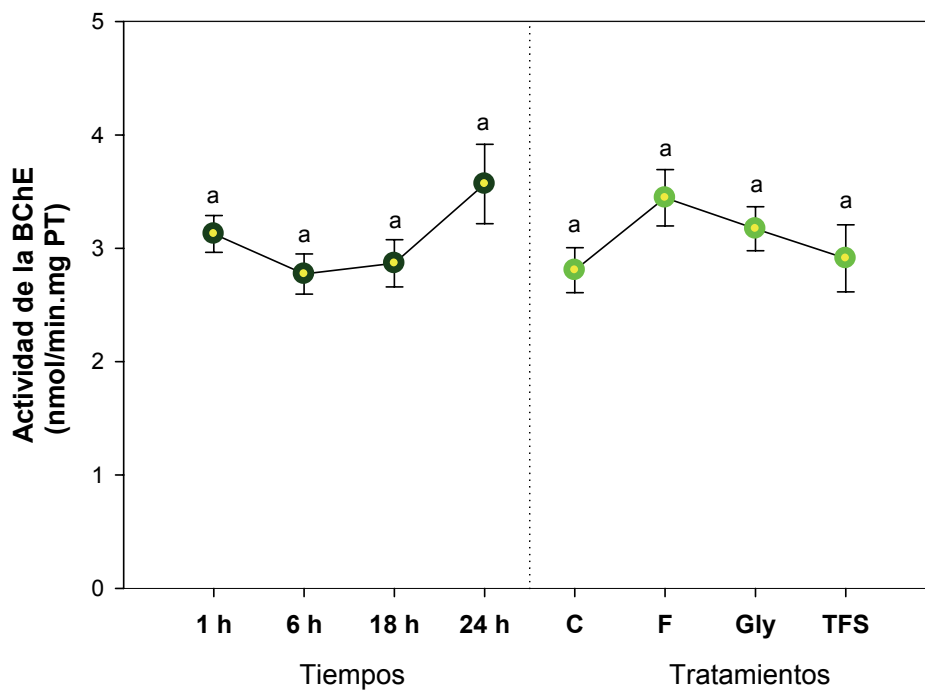
Los análisis estadísticos indicaron que existen diferencias significativas en los niveles enzimáticos de las larvas expuestas a los diferentes tratamientos (Control, F, Gly y TFS) (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,422$ ;  $F_{6,286} = 25,709$ ;  $p < 0,0001$ ), los cuales no variaron de manera significativa con respecto al tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,932$ ;  $F_{6,286} = 1,714$ ;  $p = 0,118$ ) (Figuras 42 y 43). Los ANOVAs subsiguientes mostraron diferencias significativas en la actividad de la enzima AChE (ANOVA  $F_{3,144} = 53,549$ ;  $p < 0,0001$ ) entre los individuos del grupo control con respecto a los expuestos a F (Dunnett  $p < 0,0001$ ), Gly (Dunnett  $p = 0,025$ ) y TFS (Dunnett  $p < 0,0001$ ) (Figura 42). No se detectaron cambios significativos para la BChE en las larvas de los diferentes tratamientos (ANOVA  $F_{3,144} = 2,271$ ;  $p = 0,083$ ) (Figura 43).

Asimismo, se detectó relación significativa entre el tiempo y la exposición a los plaguicidas sobre la actividad enzimática (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,761$ ;  $F_{18,286} = 2,333$ ;  $p = 0,002$ ), sin embargo la interacción sólo fue significativa para la AChE (ANOVA  $F_{9,144} = 2,620$ ;  $p = 0,008$ ).





**Figura 42:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Rhinella arenarum*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



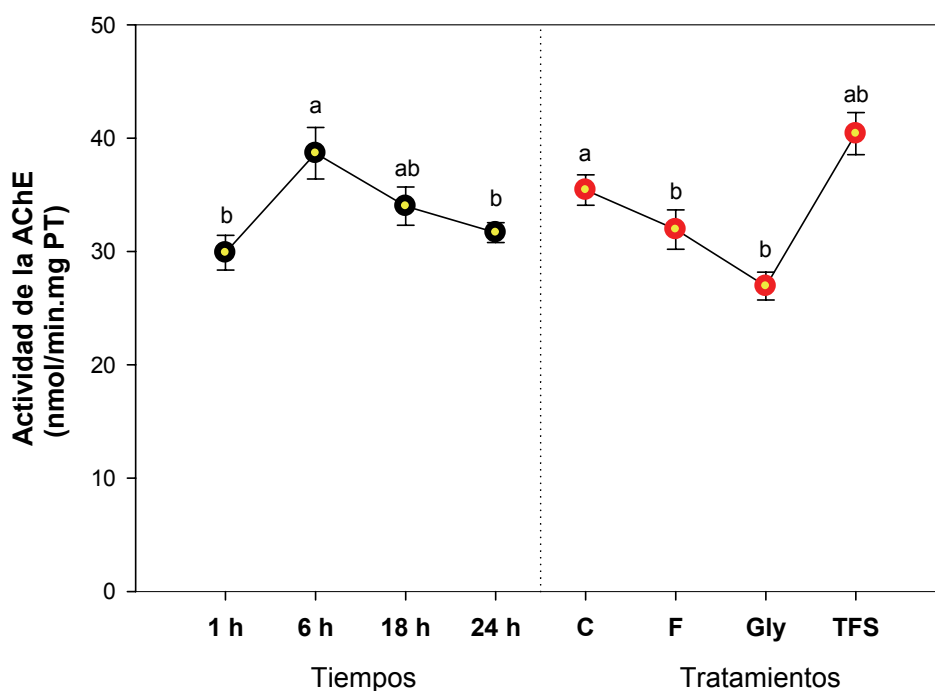
**Figura 43:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Rhinella arenarum*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

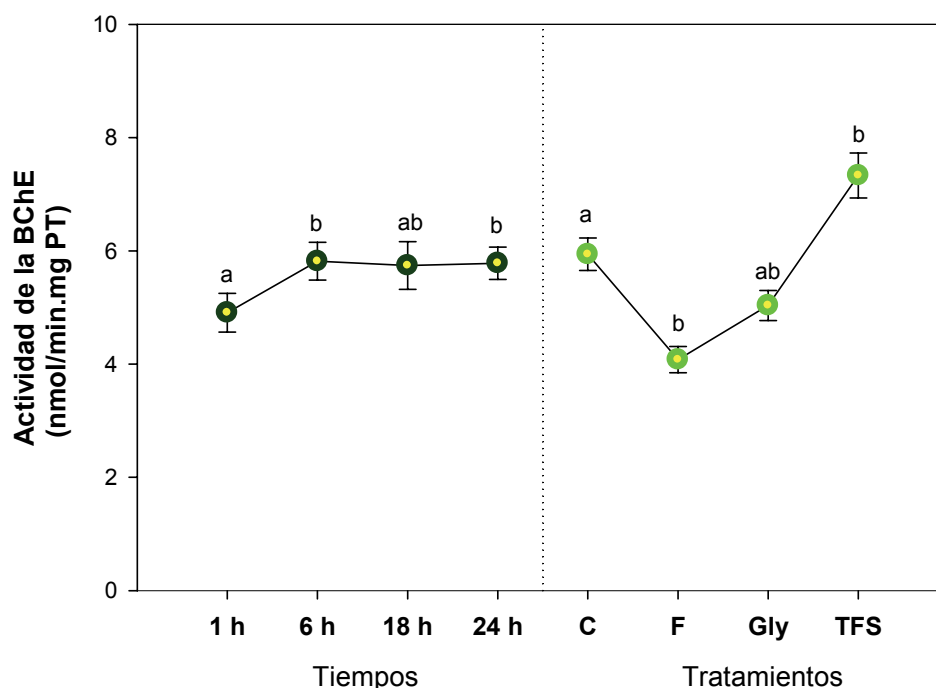
- ***Leptodactylus latrans***

La actividad enzimática de las larvas de *L. latrans* varió significativamente en función del tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,819$ ;  $F_{6,280} = 4,912$ ;  $p < 0,0001$ ), de la exposición a los plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,519$ ;  $F_{6,280} = 18,106$ ;  $p < 0,0001$ ), y debido a la interacción de ambos factores (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,551$ ;  $F_{18,280} = 5,402$ ;  $p < 0,0001$ ).

Los niveles de AChE variaron de acuerdo al tiempo (ANOVA  $F_{3,141} = 7,068$ ;  $p = 0,00018$ ), presentado diferencias para las 6 h con respecto a 1 h (Tukey  $p = 0,00012$ ) y 24 h (Tukey  $p = 0,042$ ) (Figura 44). También se observó variación en el tiempo en los niveles de BChE (ANOVA  $F_{3,141} = 3,737$ ;  $p = 0,013$ ), principalmente entre 1 h con 6 h (Tukey  $p = 0,043$ ) y 1 h con 24 h (Tukey  $p = 0,016$ ) (Figura 45). La exposición a los plaguicidas modificó la actividad de la AChE (ANOVA  $F_{3,141} = 19,940$ ;  $p < 0,0001$ ) y la BChE (ANOVA  $F_{3,141} = 22,112$ ;  $p < 0,0001$ ), presentando para la AChE diferencias entre el control con F (Dunnett  $p = 0,036$ ) y Gly (Dunnett  $p < 0,0001$ ) (Figura 44), mientras que para la BChE las diferencias fueron debidas a la exposición a F (Dunnett  $p < 0,0001$ ) y TFS (Dunnett  $p = 0,018$ ) (Figura 45). También se observó relación significativa en los niveles enzimáticos con respecto al tiempo y a los tratamientos de exposición para las variables AChE (ANOVA  $F_{9,141} = 7,261$ ;  $p < 0,0001$ ) y BChE (ANOVA  $F_{9,141} = 4,540$ ;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 44:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Leptodactylus latrans*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

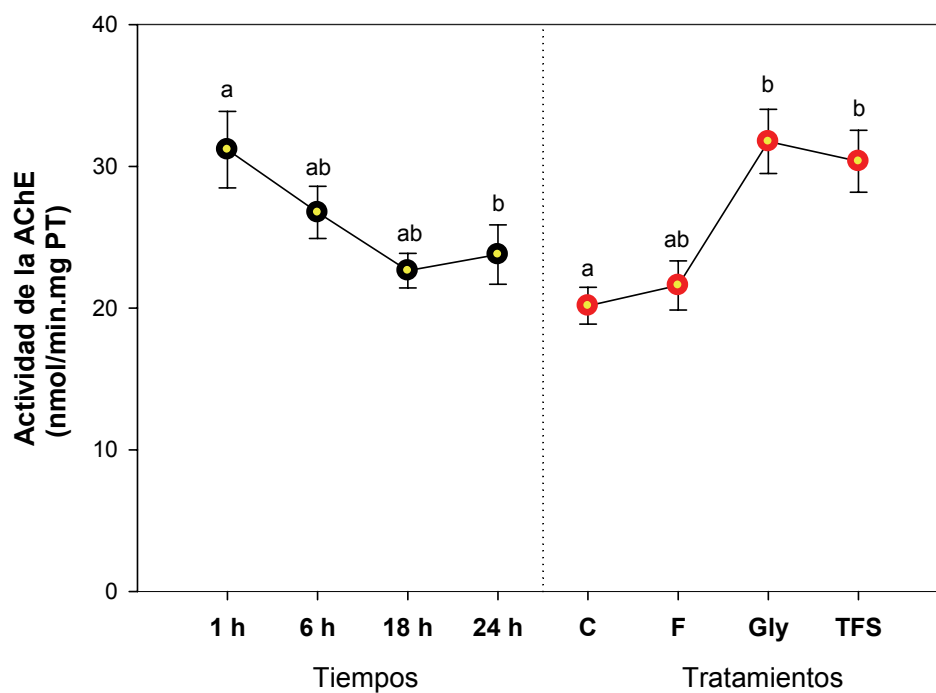


**Figura 45:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Leptodactylus latrans*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

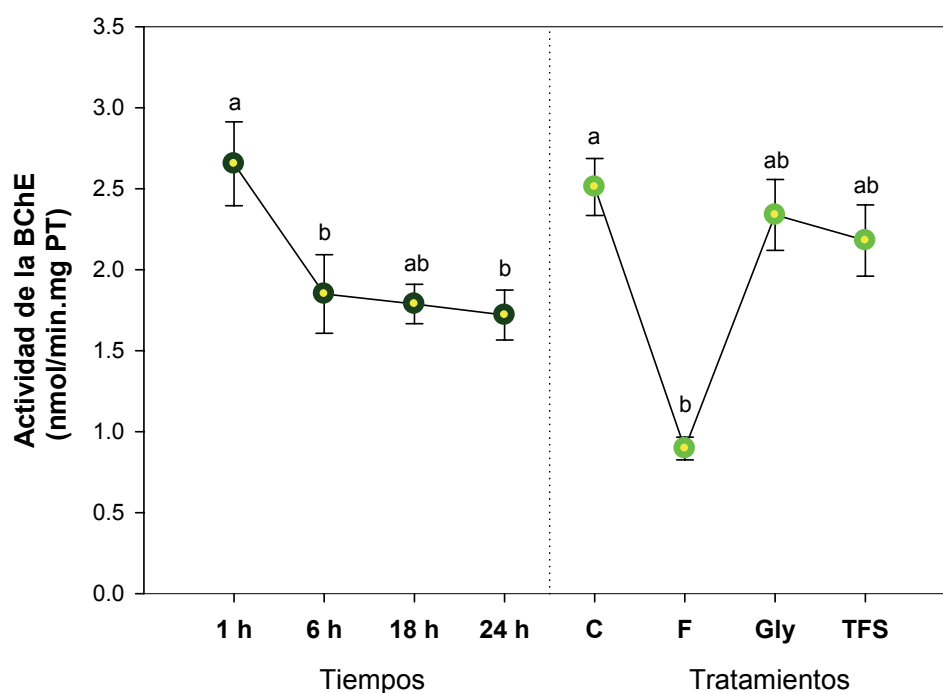
- *Leptodactylus chaquensis*

Los análisis multivariados indicaron que la actividad enzimática fue significativamente afectada por el tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,860$ ;  $F_{6,282} = 3,673$ ;  $p = 0,0015$ ), los tratamientos de exposición (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,529$ ;  $F_{6,282} = 17,600$ ;  $p < 0,0001$ ) y la interacción de ambos factores (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,776$ ;  $F_{18,282} = 2,112$ ;  $p = 0,006$ ). Los subsiguientes ANOVAs mostraron el tiempo influyó sobre la actividad de la AChE (ANOVA  $F_{3,142} = 3,018$ ;  $p = 0,0032$ ) y la BChE (ANOVA  $F_{3,142} = 4,063$ ;  $p = 0,008$ ). Para la primera, las diferencias se presentaron entre 1 h y 24 h (Tukey  $p = 0,018$ ; Figura 46), mientras que para la segunda las diferencias fueron entre 6 h (Tukey  $p = 0,002$ ) y 24 h (Tukey  $p = 0,013$ ) con respecto a 1 h (Figura 47). La exposición a los plaguicidas también influyó sobre las respectivas actividades enzimáticas. La AChE (ANOVA  $F_{3,142} = 11,084$ ;  $p < 0,0001$ ) varió con respecto al control por la exposición a Gly (Dunnett  $p < 0,0001$ ) y TFS (Dunnett  $p = 0,0004$ )

(Figura 46); y la BChE (ANOVA  $F_{3,142} = 21,364$ ;  $p < 0,0001$ ) fue afectada por la exposición a F (Dunnett  $p < 0,0001$ ; Figura 47). Asimismo, se comprobó que la interacción del tiempo y la exposición a los diferentes tratamientos sólo fue significativa para la AChE (ANOVA  $F_{9,142} = 3,889$ ;  $p = 0,004$ ).



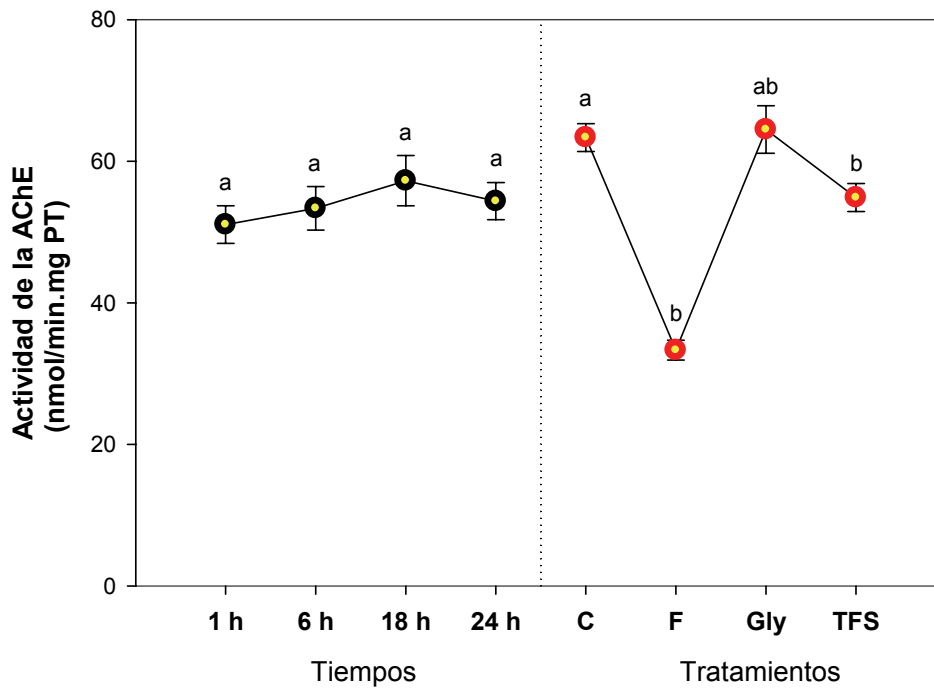
**Figura 46:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Leptodactylus chaquensis*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



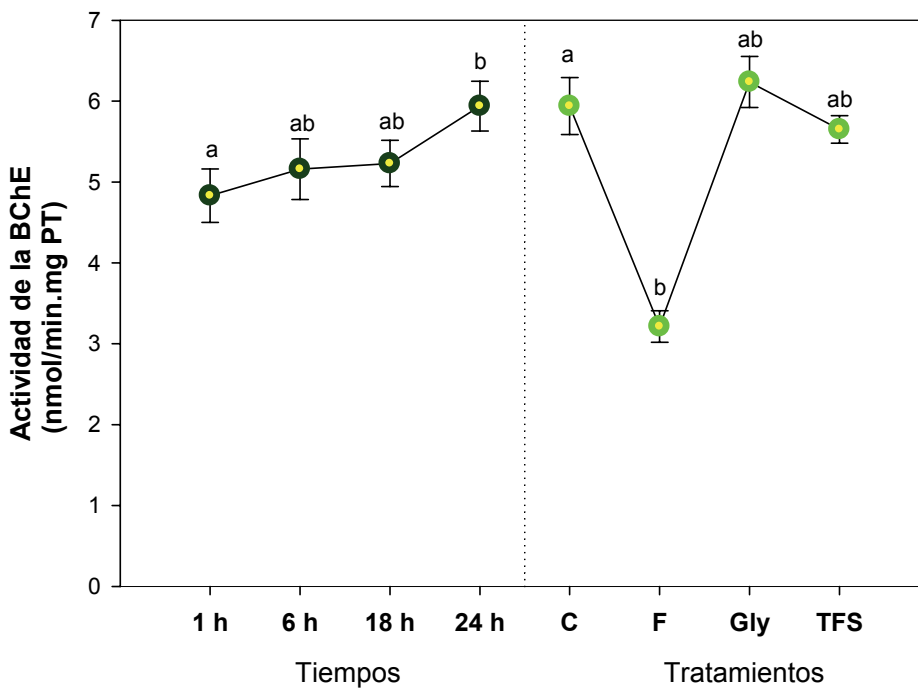
**Figura 47:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Leptodactylus chaquensis*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

- *Physalaemus albonotatus*

Para esta especie, los niveles de actividad enzimática fueron modificados por el tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,829$ ;  $F_{6,286} = 2,284$ ;  $p = 0,045$ ) y los tratamientos de exposición (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,378$ ;  $F_{6,286} = 29,900$ ;  $p < 0,0001$ ), aunque no así por la combinación de ambos factores (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,836$ ;  $F_{18,286} = 1,488$ ;  $p = 0,093$ ). Los ANOVAs individuales demostraron que la actividad enzimática no varió a lo largo del tiempo para la AChE (ANOVA  $F_{3,144} = 1,225$ ;  $p = 0,303$ ; Figura 48), aunque si lo hizo la BChE (ANOVA  $F_{3,142} = 3,468$ ;  $p = 0,0018$ ; Figura 49), presentando diferencias significativas entre 1 h y 24 h (Tukey  $p = 0,011$ ). En cambio, la exposición a los plaguicidas fue un factor que demostró tener efecto sobre las dos variables analizadas. Los niveles de AChE de las larvas expuestas a F (Dunnett  $p < 0,0001$ ) y a TFS (Dunnett  $p = 0,018$ ) fueron los que presentaron diferencias con respecto a los valores del control (ANOVA  $F_{3,144} = 49,104$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 48). Mientras que para la BChE (ANOVA  $F_{3,144} = 35,546$ ;  $p < 0,0001$ ), la diferencia en los niveles de actividad enzimática con el control fue debido a la exposición de las larvas a F (Dunnett  $p < 0,0001$ , Figura 49).



**Figura 48:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Physalaemus albonotatus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

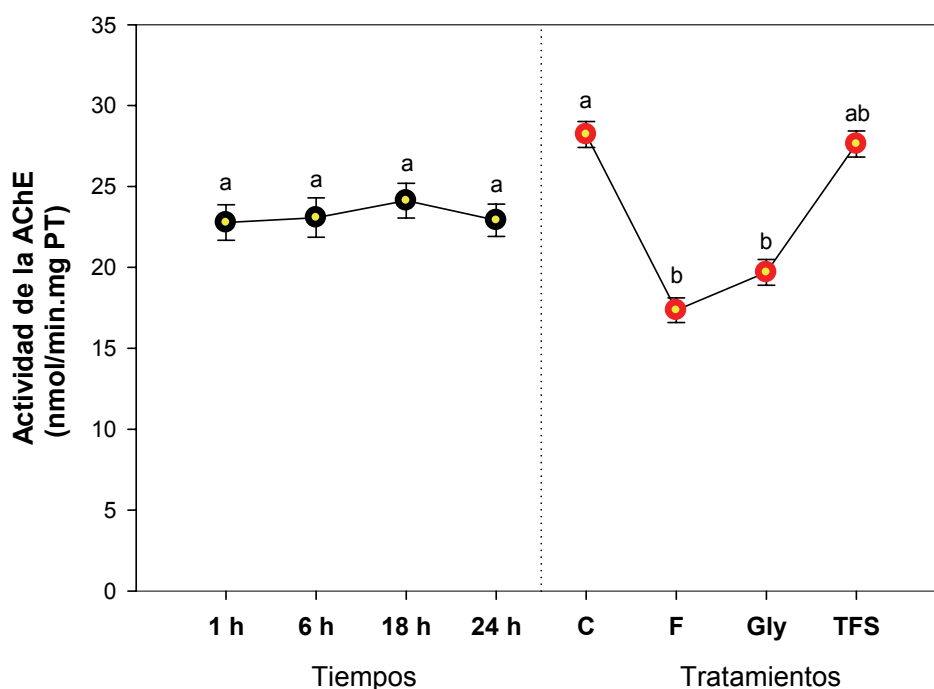


**Figura 49:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Physalaemus albonotatus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett

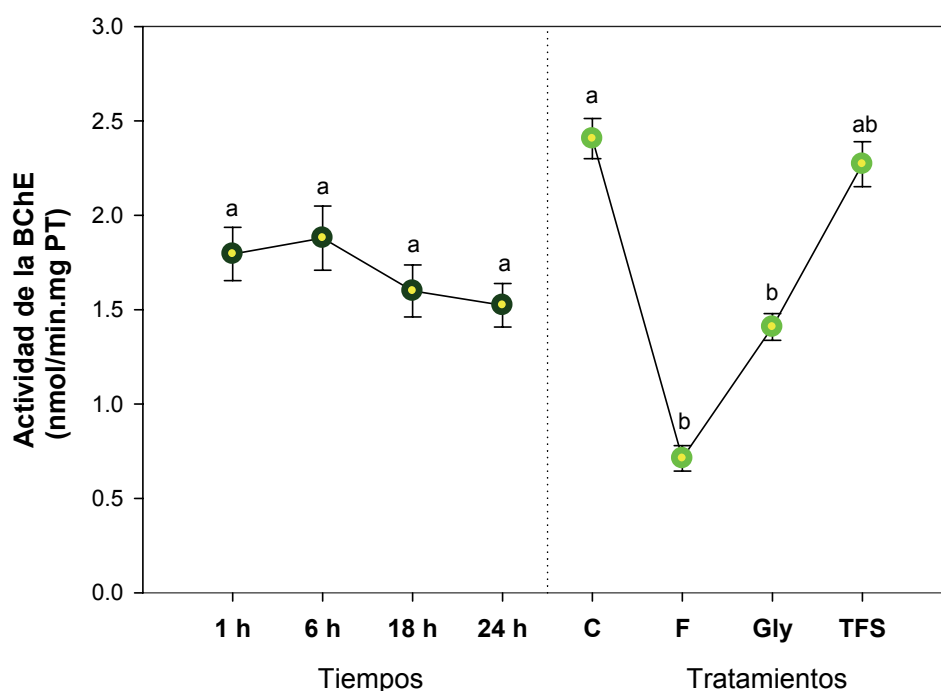
entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

- *Physalaemus santafecinus*

Los análisis estadísticos indicaron que existen diferencias significativas en la actividad de las enzimas AChE y BChE cuando las larvas fueron expuestas a los diferentes tratamientos (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,234$ ;  $F_{6,286} = 50,900$ ;  $p < 0,0001$ ). Los resultados también mostraron que la actividad enzimática no varió significativamente con el tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,918$ ;  $F_{6,286} = 2,091$ ;  $p = 0,054$ ) (Figuras 50 y 51), y que tampoco existió relación significativa entre los factores tiempo y tratamiento (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,844$ ;  $F_{18,286} = 1,403$ ;  $p = 0,129$ ). Los ANOVAs subsecuentes mostraron diferencias en la actividad de la AChE (ANOVA  $F_{3,144} = 51,929$ ;  $p < 0,0001$ ) y la BChE (ANOVA  $F_{3,144} = 114,788$ ;  $p < 0,0001$ ) como consecuencia de la exposición a F y Gly (Dunnett  $p < 0,0001$ , respectivamente para las dos variables) con respecto a la actividad enzimática del tratamiento control (Figuras 50 y 51).



**Figura 50:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Physalaemus santafecinus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

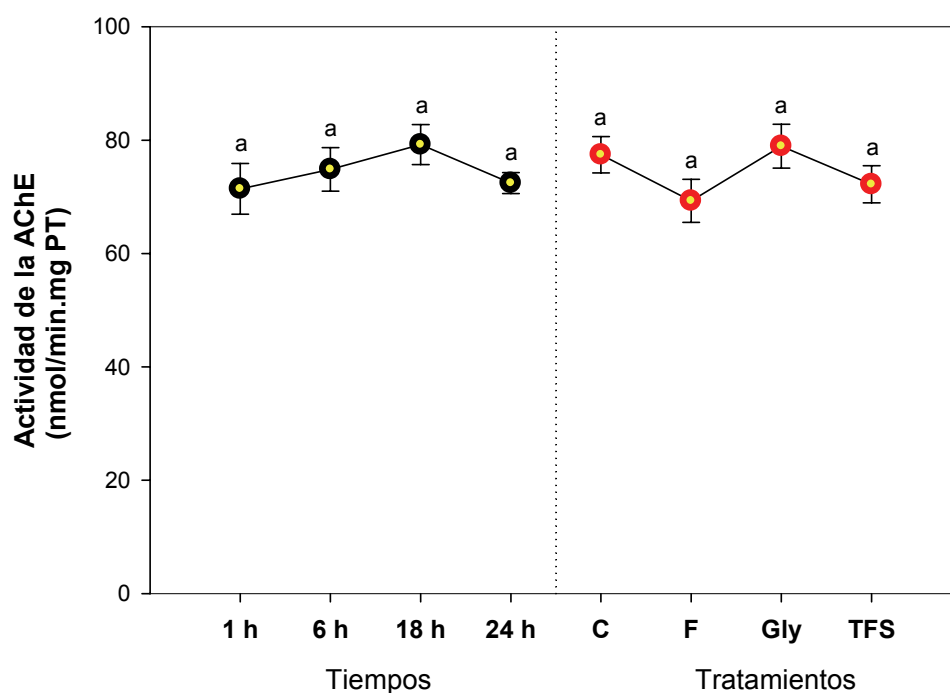


**Figura 51:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Physalaemus santafecinus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

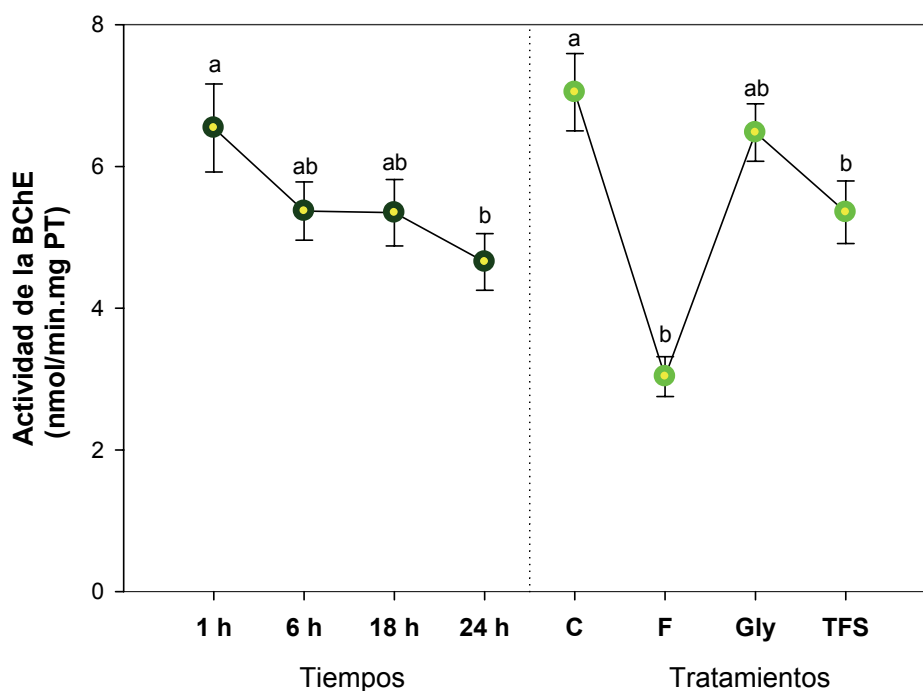
- *Physalaemus riograndensis*

La actividad enzimática fue afectada significativamente por el tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,781$ ;  $F_{6,286} = 6,276$ ;  $p < 0,0001$ ), la exposición a los diferentes tratamientos (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,532$ ;  $F_{6,286} = 17,665$ ;  $p < 0,0001$ ) y por la interacción de ambos factores evaluados (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,723$ ;  $F_{18,286} = 2,803$ ;  $p = 0,00016$ ). Los resultados de los ANOVAs demostraron que la actividad de la enzima BChE fue la que varió significativamente a lo largo del tiempo (ANOVA  $F_{3,144} = 4,118$ ;  $p = 0,008$ ; Figura 53) y con los tratamientos de exposición (ANOVA  $F_{3,144} = 33,633$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 53), resultando significativa también la relación de la actividad enzimática con el tiempo y los tratamientos (ANOVA  $F_{9,144} = 2,225$ ;  $p = 0,024$ ). Las diferencias significativas se observaron entre 1 h con respecto a las 24 h (Tukey  $p = 0,003$ ), y entre el control con respecto a F (Dunnett  $p < 0,0001$ ) y TFS (Dunnett  $p = 0,008$ ). Por su parte, la actividad de la enzima AChE no varió con el tiempo (ANOVA  $F_{3,144} = 1,793$ ;  $p = 0,151$ , Figura 52) y con la exposición a plaguicidas (ANOVA  $F_{3,144} = 2,347$ ;  $p = 0,075$ ; Figura 52), y tampoco fue significativa la interacción de ambos factores (ANOVA  $F_{9,144} = 1,690$ ;  $p = 0,103$ ).





**Figura 52:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Physalaemus riograndensis*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

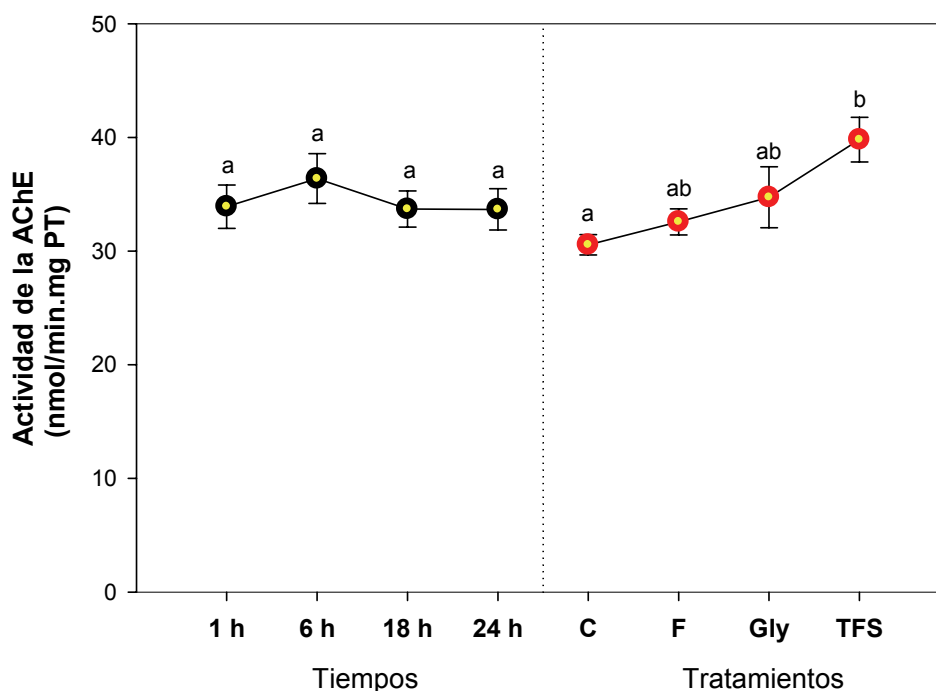


**Figura 53:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Physalaemus riograndensis*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

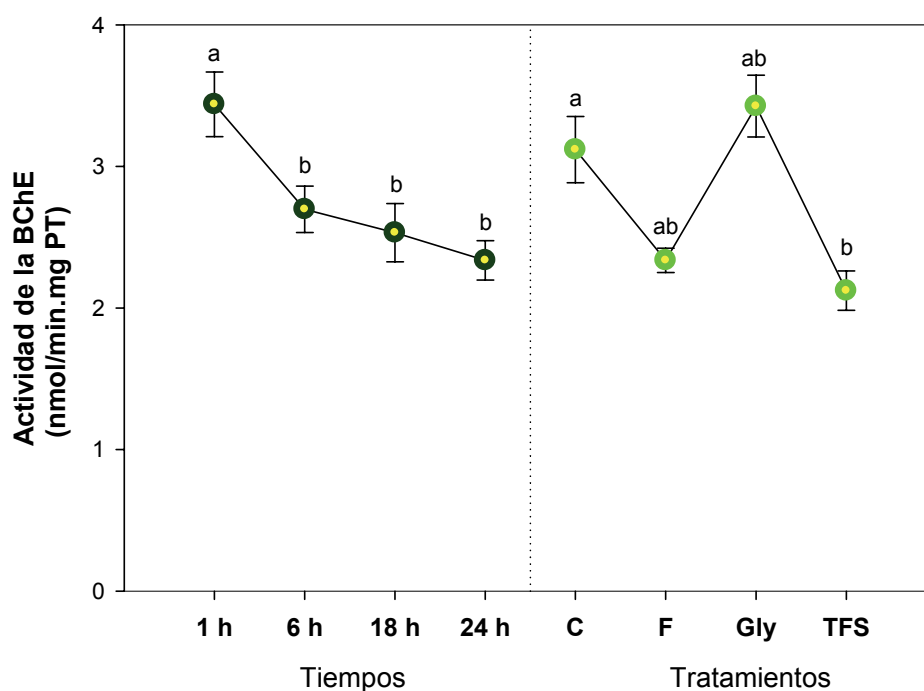
- *Trachycephalus typhonius*

Los niveles de actividad enzimática en *T. typhonius* fueron modificados por el tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,867$ ;  $F_{6,286} = 3,534$ ;  $p = 0,0021$ ) y los tratamientos de exposición (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,714$ ;  $F_{6,286} = 8,760$ ;  $p < 0,0001$ ), y también fue significativa la interacción de ambos factores (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,668$ ;  $F_{18,286} = 3,548$ ;  $p < 0,0001$ ). Los resultados de los ANOVAs demostraron que la actividad de la enzima BChE varió significativamente con el tiempo (ANOVA  $F_{3,144} = 6,406$ ;  $p = 0,0004$ , Figura 55), principalmente entre 1 h con las 6 h (Tukey  $p = 0,028$ ), 18 h (Tukey  $p = 0,002$ ) y 24 h (Tukey  $p = 0,001$ ), mientras que la actividad de la AChE no cambió durante los períodos de tiempo evaluados (ANOVA  $F_{3,144} = 0,670$ ;  $p = 0,572$ ; Figura 54). La exposición a los plaguicidas mostró alterar los niveles de AChE (ANOVA  $F_{3,144} = 5,534$ ;  $p = 0,001$ ) y BChE (ANOVA  $F_{3,144} = 10,796$ ;  $p < 0,0001$ ), siendo el plaguicida TFS quien marcó las diferencias significativas con la actividad enzimática del control, tanto para la AChE (Dunnett  $p = 0,001$ ; Figura 54) como para la BChE (Dunnett  $p = 0,002$ ; Figura 55). La interacción de los factores tiempo y exposición a plaguicidas sólo fue significativa para la AChE (ANOVA  $F_{9,144} = 6,594$ ;  $p < 0,0001$ ), pero no para la BChE (ANOVA  $F_{9,144} = 1,522$ ;  $p = 0,145$ ).



**Figura 54:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Trachycephalus typhonius*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error

estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

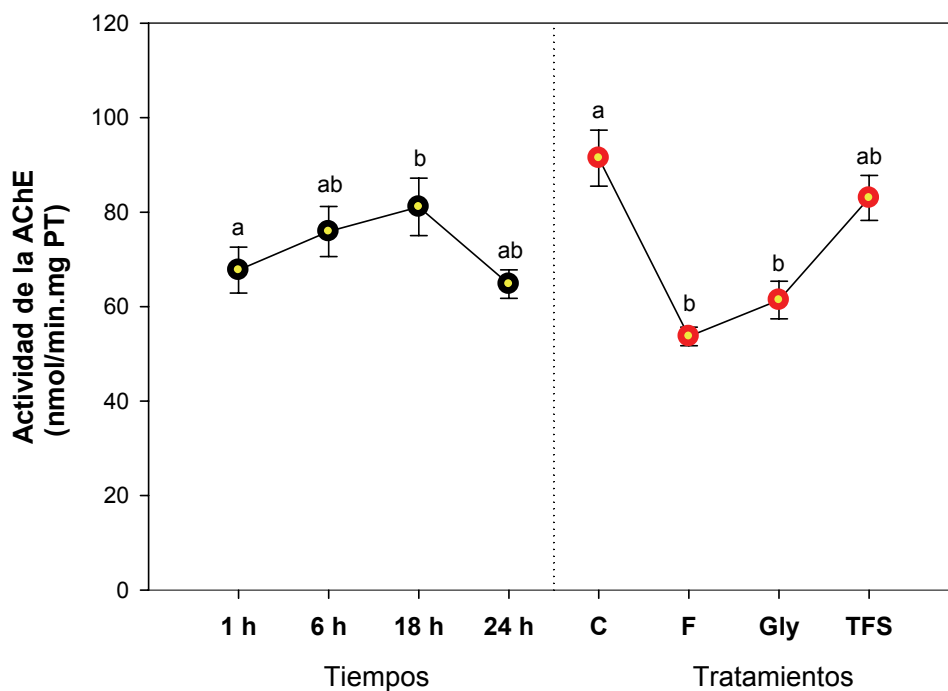


**Figura 55:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Trachycephalus typhonius*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

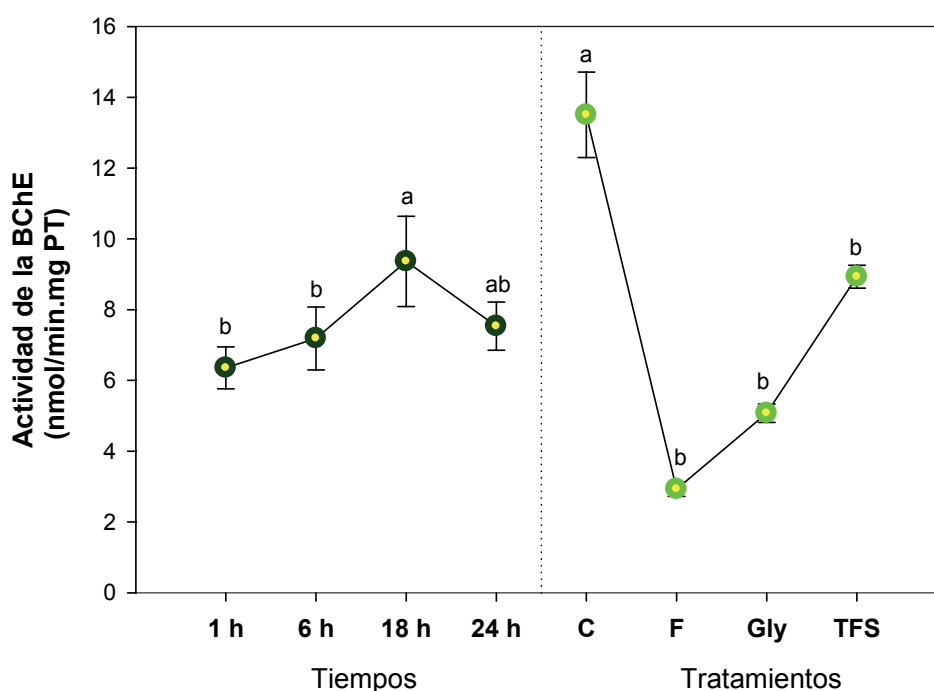
- ***Hypsiboas pulchellus***

Los análisis multivariados mostraron que la actividad enzimática fue significativamente afectada por los factores tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,792$ ;  $F_{6,286} = 5,882$ ;  $p < 0,0001$ ) y tratamientos de exposición (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,236$ ;  $F_{6,286} = 50,424$ ;  $p < 0,0001$ ), pero no se comprobó que fuera significativa la interacción de ambos factores sobre la actividad enzimática (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,824$ ;  $F_{18,286} = 1,614$ ;  $p = 0,056$ ). Para la enzima AChE (ANOVA  $F_{3,144} = 3,117$ ;  $p = 0,028$ ), los niveles de actividad variaron significativamente entre 1 h y 18 h (Tukey  $p = 0,042$ ; Figura 56), mientras que para la BChE (ANOVA  $F_{3,144} = 3,117$ ;  $p = 0,028$ ) la variación también fue entre 1 h y 18 h (Tukey  $p = 0,0004$ ), y además, entre 6 h y 18 h (Tukey  $p = 0,0003$ ) (Figura 57). La exposición a los plaguicidas modificó la actividad de las enzimas AChE (ANOVA  $F_{3,144} = 19,880$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 56) y BChE (ANOVA  $F_{3,144} = 125,445$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 57). Los niveles de AChE variaron debido a la exposición a F y Gly (Dunnett  $p < 0,0001$ , respectivamente) con respecto a los del control, mientras que para la BChE, la

exposición a los tres plaguicidas modificó significativamente la actividad enzimática (Dunnett  $p < 0,0001$ , respectivamente).



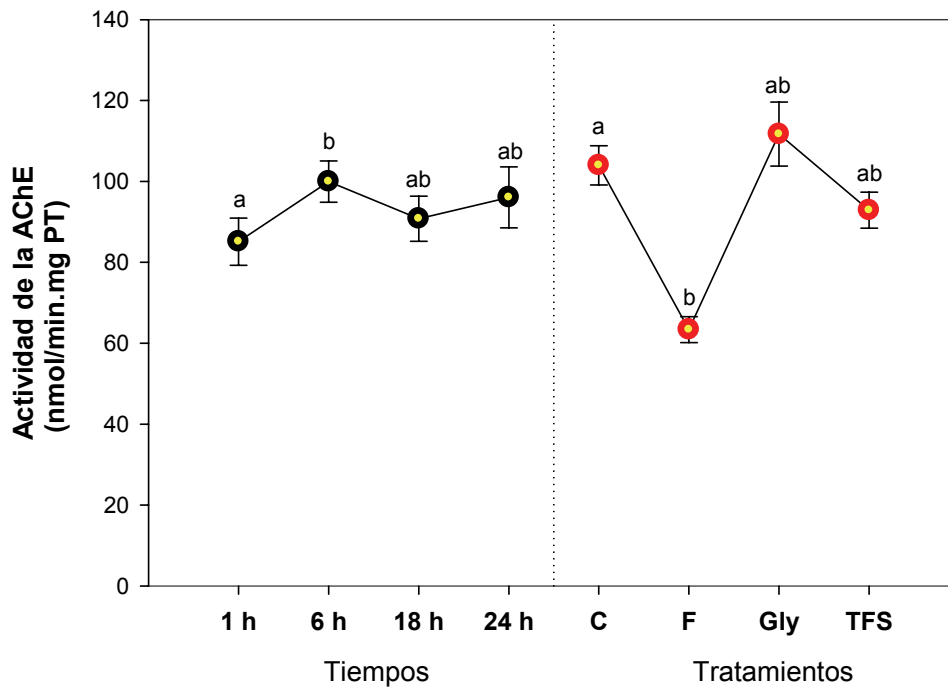
**Figura 56:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Hypsiboas pulchellus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



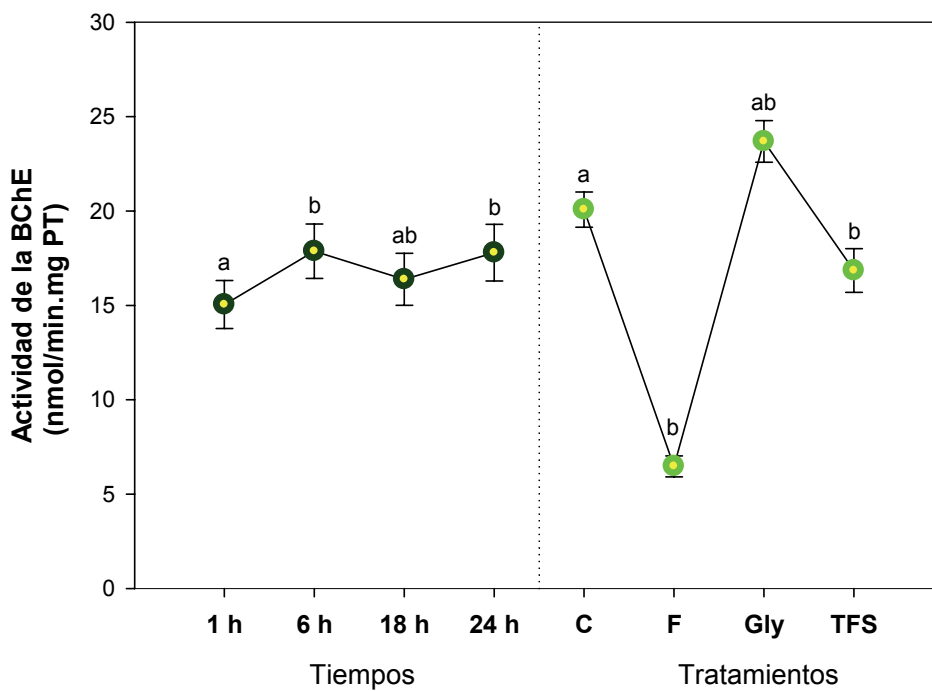
**Figura 57:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Hypsiboas pulchellus*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estándar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

- *Elachistocleis bicolor*

Los resultados de los análisis estadísticos indicaron que la actividad enzimática fue significativamente afectada por el tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,896$ ;  $F_{6,286} = 2,678$ ;  $p = 0,015$ ), por la exposición a los plaguicidas (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,290$ ;  $F_{6,286} = 40,887$ ;  $p < 0,0001$ ) y por la interacción de ambos factores (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,779$ ;  $F_{18,286} = 2,114$ ;  $p = 0,006$ ). Los ANOVAs subsiguientes mostraron cambios en la actividad de las enzimas AChE (ANOVA  $F_{3,144} = 3,020$ ;  $p = 0,032$ ; Figura 58) y BChE (ANOVA  $F_{3,144} = 4,239$ ;  $p = 0,007$ ; Figura 59) con respecto al tiempo, variando significativamente entre 1 h y 6 h (Tukey  $p = 0,025$ ) la actividad de la AChE, y entre 1 h con respecto a 6 h (Tukey  $p = 0,008$ ) y a 24 h (Tukey  $p = 0,034$ ) la actividad de la BChE. Además, la exposición a F (Dunnett  $p < 0,0001$ ) alteró la actividad de la AChE (ANOVA  $F_{3,144} = 24,441$ ;  $p < 0,0001$ ) con respecto a los valores del control (Figura 58), mientras que la BChE (ANOVA  $F_{3,144} = 115,05$ ;  $p < 0,0001$ ) fue debido a la exposición a F (Dunnett  $p < 0,0001$ ) y TFS (Dunnett  $p = 0,042$ ) (figura 59). Sólo se comprobó que la actividad de la enzima BChE (ANOVA  $F_{9,144} = 3,314$ ;  $p = 0,001$ ) presentó una relación significativa entre el tiempo y tratamientos, siendo dicha interacción no significativa para la AChE (ANOVA  $F_{9,144} = 1,920$ ;  $p = 0,053$ ).



**Figura 58:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en tejido de larvas de *Elachistocleis bicolor*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



**Figura 59:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en tejido de larvas de *Elachistocleis bicolor*. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

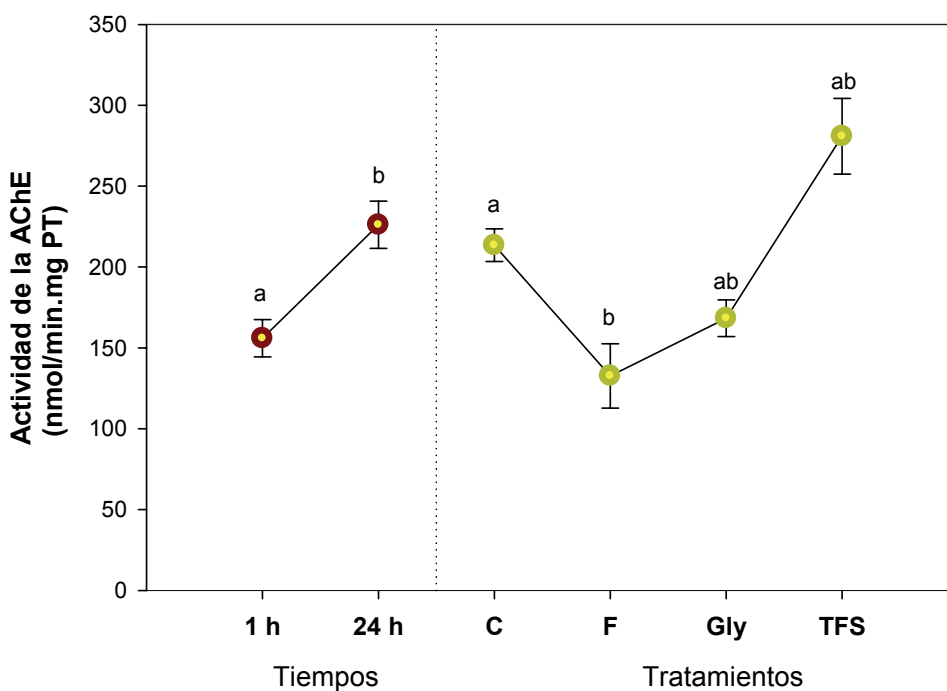
tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

#### 4.6.2. Anguilas

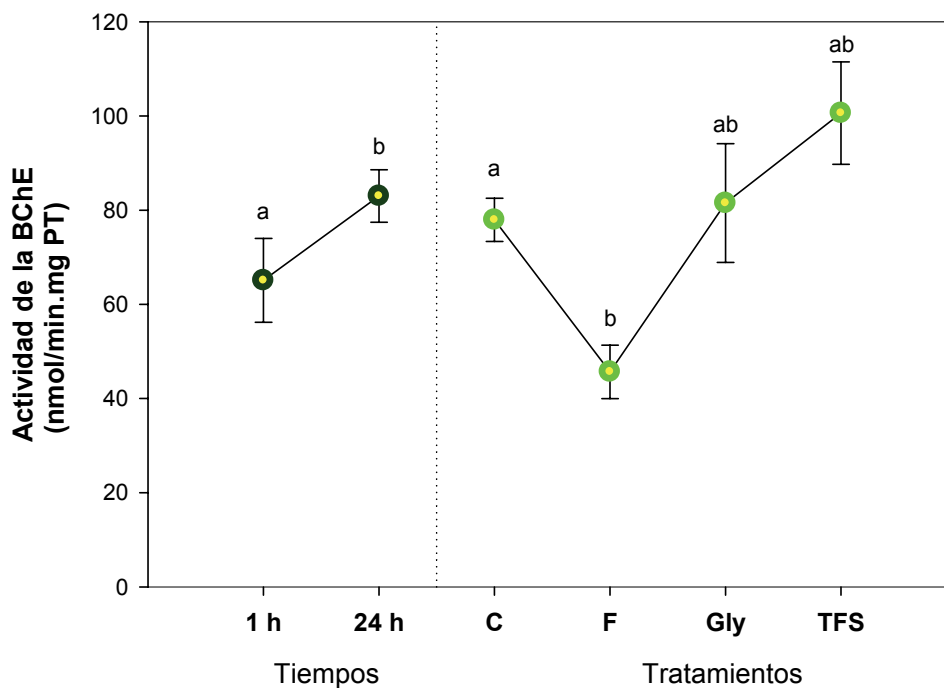
El valor promedio (media  $\pm$  es) de actividad de la enzima AChE en músculo de *S. marmoratus* no expuesto a plaguicidas (controles) fue de 213,499 ( $\pm$  18,714) nmol/min.mg de PT, mientras que el nivel promedio de actividad de la BChE en músculo fue de 77,950 ( $\pm$  4,600) nmol/min.mg de PT.

Diferencias significativas en los niveles de actividad enzimática fueron encontradas en músculo de juveniles de *S. marmoratus* con respecto al tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,814$ ;  $F_{2,71} = 9,727$ ;  $p = 0,00015$ ) y a los diferentes tratamientos de exposición (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,542$ ;  $F_{6,142} = 10,164$ ;  $p < 0,0001$ ). Sin embargo, no se halló relación significativa de la actividad enzimática con respecto a la interacción del tiempo y de los tratamientos de exposición (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,871$ ;  $F_{6,142} = 2,027$ ;  $p = 0,065$ ).

El tiempo fue un factor de influencia sobre la actividad de las enzimas AChE (ANOVA  $F_{1,72} = 21,681$ ;  $p < 0,0001$ ) y BChE (ANOVA  $F_{1,72} = 2,941$ ;  $p < 0,0001$ ), al igual que la exposición de las anguilas a las menores concentraciones de plaguicidas (F = 2 mg/l, Gly = 2,5 mg/l, TFS = 0,096 mg/l) (Figuras 60 y 61). En este sentido, los cambios fueron debido a la exposición a F sobre la actividad de las enzimas AChE (ANOVA  $F_{3,72} = 18,139$ ;  $p < 0,0001$ ) y BChE (ANOVA  $F_{3,72} = 2,793$ ;  $p = 0,001$ ), provocando la inhibición del 37,8% de la actividad de la AChE y del 41,4% de la BChE (Dunnett  $p < 0,0001$ , respectivamente) con respecto a la actividad enzimática del control. Por su parte, Gly redujo la actividad de la AChE (21,5%) y TFS provocó la inducción de la AChE (31,6%) y la BChE (29,1%), sin embargo, estas variaciones fueron no significativas (Dunnett  $p > 0,05$ ) con respecto a la actividad enzimática del control.



**Figura 60:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en músculo de juveniles de *Synbranchus marmoratus* bajo la exposición a las concentraciones más bajas de plaguicidas. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



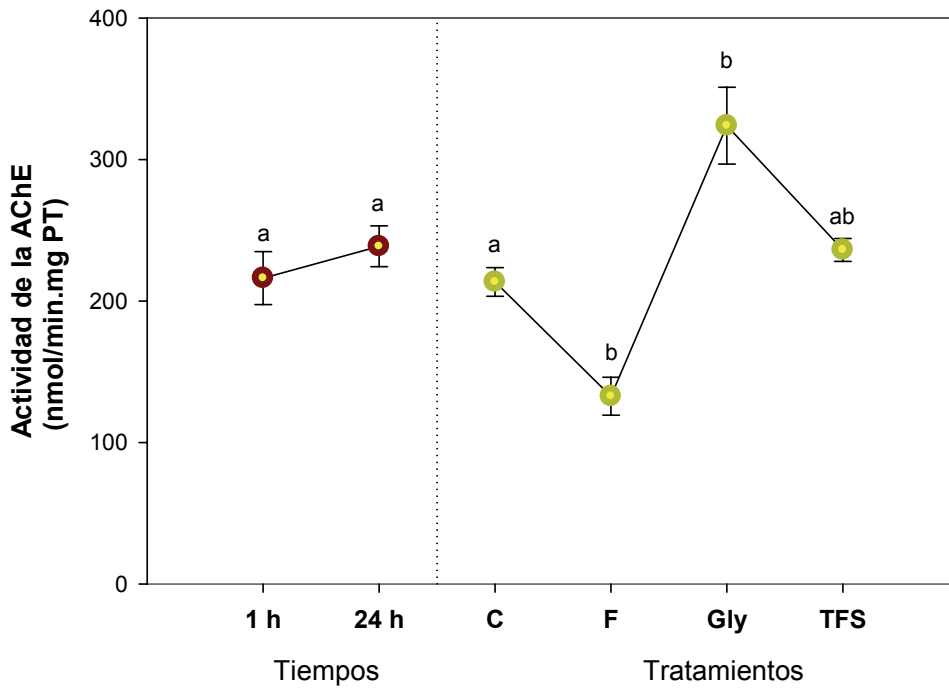
**Figura 61:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima BChE en músculo de juveniles de *Synbranchus marmoratus* bajo la exposición a las concentraciones más bajas de plaguicidas. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



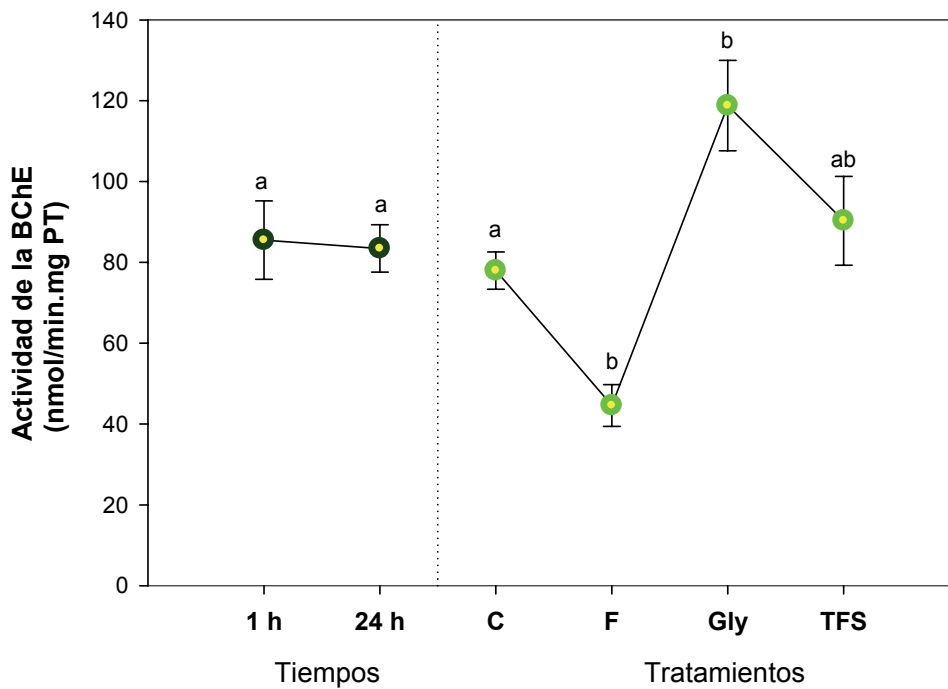
indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

La exposición de *S. marmoratus* a las mayores concentraciones de plaguicidas (F = 3,12 mg/l; Gly = 21,5 mg/l; TFS = 0,66 mg/l) modificó de manera significativa los niveles de actividad enzimática (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,440$ ;  $F_{6,142} = 14,042$ ;  $p < 0,0001$ ). La actividad de las enzimas AChE (ANOVA  $F_{3,72} = 34,818$ ;  $p < 0,0001$ ) y BChE (ANOVA  $F_{3,72} = 28,646$ ;  $p < 0,0001$ ) fue alterada por la exposición a los plaguicidas (Figuras 62 y 63). Es así que, el insecticida F causó la inhibición del 62,12% de la actividad de la AChE (Dunnett  $p < 0,0001$ ) y la inhibición del 42,8% de la actividad de la BChE (Dunnett  $p < 0,0001$ ), con respecto a los niveles enzimáticos del control. La exposición al herbicida Gly originó un aumento en los niveles de AChE del 51,6% (Dunnett  $p = 0,001$ ) y del 52,4% para la BChE (Dunnett  $p = 0,0094$ ). El fungicida TFS también aumentó la actividad de la AChE (10,6%) y de la BChE (15,8%), pero estas diferencias fueron no significativas con respecto al control (Dunnett  $p > 0,005$ ).

Los niveles de actividad enzimática no variaron en función del tiempo (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,949$ ;  $F_{2,71} = 1,505$ ;  $p = 0,176$ ; Figuras 62 y 63), pero si fue significativa la relación de la actividad enzimática con el tiempo y los tratamientos (MANOVA Wilks  $\lambda = 0,659$ ;  $F_{6,142} = 6,405$ ;  $p < 0,0001$ ) tanto para la AChE (ANOVA  $F_{3,72} = 9,076$ ;  $p < 0,0001$ ) como para la BChE (ANOVA  $F_{3,72} = 10,207$ ;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 62:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en músculo de juveniles de *Synbranchus marmoratus* bajo la exposición a las concentraciones más altas de plaguicidas. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).



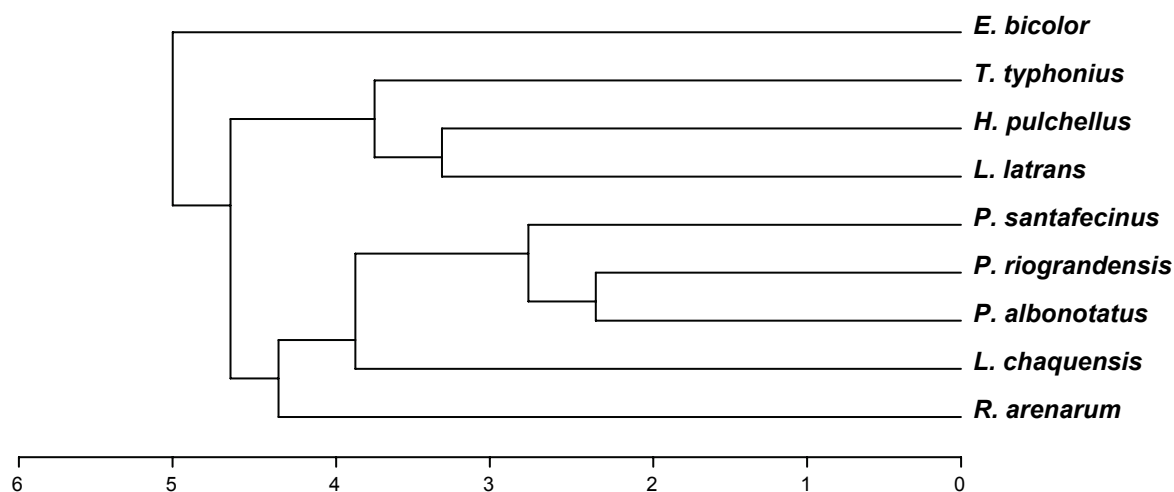
**Figura 63:** Efecto de los tiempos y los tratamientos sobre la actividad de la enzima AChE en músculo de juveniles de *Synbranchus marmoratus* bajo la exposición a las concentraciones más altas de plaguicidas. Cada punto representa la media aritmética y las barras el error estandar. Las letras sobre las barras

indican las diferencias para el test de Tukey entre tiempos y Dunnett entre tratamientos (letras iguales = no hay diferencias significativas; letras diferentes = existen diferencias significativas).

#### 4.7. Evaluación interespecífica de las variables analizadas

Con la finalidad de encontrar similitudes entre las diferentes especies de anfibios estudiadas, se examinaron de manera conjunta variables morfológicas y ecotoxicológicas, y de respuesta (depredación, etológicas y metabólicas) a la exposición a plaguicidas, mediante un análisis de clasificación numérica (cluster) para cada plaguicida evaluado.

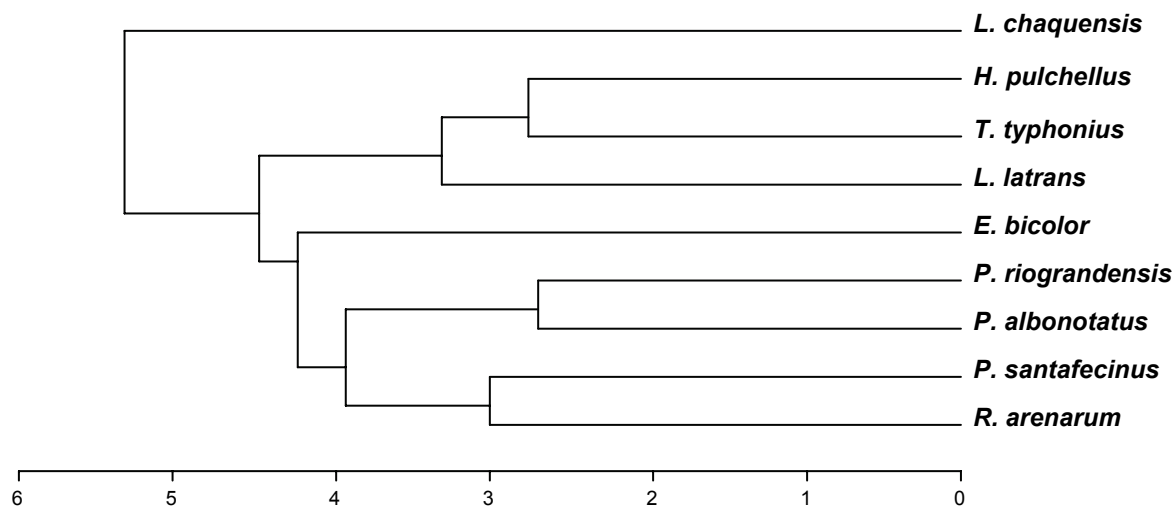
De acuerdo con el resultado del fenograma correspondiente al agrupamiento de las especies de anfibios bajo la exposición a F (Figura 64), se puede observar cómo la especie *E. bicolor* conforma el primer grupo que se separa claramente del resto de las larvas de anfibios, que a su vez, se reúnen en dos grupos diferentes. Las especies *T. typhonius*, *H. pulchellus* y *L. latrans* conforman un agrupamiento notoriamente diferenciado; mientras que en el otro agrupamiento, se puede observar cómo las tres especies de *Physalaemus* se encuentran relacionadas estrechamente y de manera más aisladas se encuentran *L. chaquensis* y *R. arenarum*.



**Figura 64:** Fenograma de similitud entre las diferentes especies de anfibios según características morfológicas, ecotoxicológicas y variables-respuesta (depredación, comportamentales y metabólicas) bajo la exposición al insecticida fenitrothion (Método UPGMA).

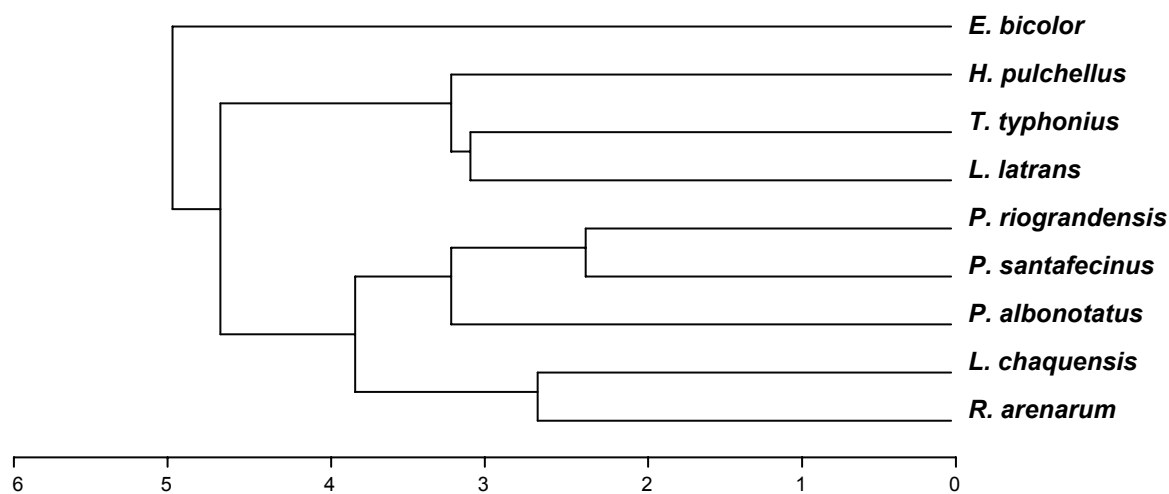
El análisis integral multivariante de similitud para el herbicida Gly evidenció en su fenograma (Figura 65) que *L. chaquensis* se separa las restantes especies conformando un solo grupo. También, en coincidencia con el fenograma para el insecticida F, se aprecia que las

especies *H. pulchellus*, *T. typhoni* y *L. latrans* se reúnen en un grupo definido, mientras que otro grupo involucra a las tres especies de *Physalaemus*, *R. arenarum*, y *E. bicolor* que se suma a éste grupo a un nivel de distancia mayor que las demás especies del grupo.



**Figura 65:** Fenograma de similitud entre las diferentes especies de anfibios según características morfológicas, ecotoxicológicas y variables-respuesta (depredación, comportamentales y metabólicas) bajo la exposición al herbicida glifosato (Método UPGMA).

El fenograma obtenido a partir de la matriz de semejanzas entre las especies de anfibios bajo la exposición al fungicida TFS (Figura 66) muestra que el primer agrupamiento reúne a *E. bicolor*, especie que parece estar completamente aislada del resto. También se observa un agrupamiento definido que reúne a las especies *H. pulchellus*, *T. typhoni* y *L. latrans*. Otro grupo de larvas de anfibios está integrado por las tres especies de *Physalaemus*, y un último agrupamiento conformado por *L. chaquensis* y *R. arenarum*.



**Figura 66:** Fenograma de similitud entre las diferentes especies de anfibios estudiadas según características morfológicas, ecotoxicológicas y variables-respuesta (depredación, comportamentales y metabólicas) bajo la exposición al fungicida trifloxistrobin (Método UPGMA).

Las disimilitudes más notables entre los tres agrupamientos analizados (Figuras 64, 65 y 66) corresponden, por un lado a que *E. bicolor*, en el primer y tercer cluster quedó aislada de las restantes especies, mientras que para el segundo cluster se ubicó junto con las tres especies de *Physalaemus* y *R. arenarum*, pero a un nivel de distancia mayor. Por otro lado, en el segundo cluster *L. chaquensis* se separa de las demás especies, pero en el primer y tercer cluster se agrupa junto con las tres especies de *Physalaemus* y con *R. arenarum*. Sin embargo, en los tres clusters analizados se observaron agrupamientos con similitudes comunes. Uno de ellos estuvo conformado por las tres especies de *Physalaemus*, mientras que otro grupo reunió a *L. latrans*, *T. typhoni* e *H. pulchellus*, estas últimas, especies filogenéticamente no emparentadas.

## 5. DISCUSIÓN

---

### 5.1. Ecotoxicidad

La toxicidad ( $CL_{50-24h}$ ) varió entre los agroquímicos evaluados, siendo más tóxico para las larvas de anfibios consideradas el fungicida TFS, que registró valores de  $CL_{50-24 h}$  entre 0,1 y 0,9 mg/l, seguido por F ( $CL_{50-24 h}$  entre 2,25 y 3,65 mg/l), y luego por Gly ( $CL_{50-24 h}$  entre 5,12 y 22,85 mg/l).

En este sentido, los datos de toxicidad obtenidos en este estudio pueden ser comparados con el valor recientemente informado para TFS por Hooser y col. (2012), quienes obtuvieron en larvas de *Bufo cognatus* una  $CL_{50-72 h}$  de 0,104 mg/l para el formulado comercial Stratego®. A pesar de que en este trabajo se evaluó el efecto tóxico del TFS sobre una única especie, no se dispone hasta el momento de datos ecotoxicológicos señalados para otras especies de anfibios. De este modo, podemos concluir que el valor de toxicidad obtenido por Hooser y col. (2012) es próximo al límite inferior del rango de valores informados en este trabajo de tesis, poniendo en evidencia que el fungicida TFS es altamente tóxico para las larvas de anfibios. Del mismo modo, el valor de protección estimado obtenido (0,0617 mg/l) es también indicativo de la toxicidad de este compuesto, ya que serían necesarias concentraciones acuáticas ambientales inferiores a 0,0617 mg/l para asegurar la protección del 95% de las larvas

de anfibios evaluadas. Es de destacar, vale la pena aclarar, que los datos ecotoxicológicos obtenidos en esta tesis serían los primeros registros de toxicidad para TFS en las larvas de *Rhinella arenarum*, *Leptodactylus latrans*, *L. chaquensis*, *Physalaemus albonotatus*, *P. santafecinus*, *P. riograndensis*, *Trachycephalus typhoni*, *Hypsiboas pulchellus* y *Elachistocleis bicolor*.

Para el caso de F, los valores de  $CL_{50}$  hallados en esta tesis son comparables con los publicados por Hashimoto y Nishiuchi (1981) para larvas de *Bufo bufo japonicus*, *Rana brevipoda* y *R. catesbiana* (entre 1,2-15 mg/l), aunque el valor máximo registrado (3,65 mg/l) fue considerablemente más bajo. Sin embargo, los datos obtenidos presentan mayor concordancia con los reportados por Berril y col. (1994), quienes describen efectos severos en larvas de *Rana pipiens*, *R. clamitans* y *R. catesbeiana* luego de la exposición a 2,4 y 4 mg/l de F durante 24 h, así como también parálisis en las larvas de *R. catesbeiana* expuestas a 1 y 2 mg/l. Aunque los estudios sobre la toxicidad de F son escasos, y particularmente sobre la anfibiofauna regional, la información obtenida a partir de los ensayos ecotoxicológicos constituye una importante contribución al conocimiento sobre la toxicidad de la fauna neotropical.

Con respecto a la toxicidad de Gly, los valores letales obtenidos (5,12 y 22,85 mg/l) son comparables con estimaciones previas de  $Cl_{50-48 h}$  correspondientes a larvas de anfibios australianas (*Crinia insignifera*, *Heleioporus eyrei*, *Limnodynastes dorsalis* y *Litoria moorei*) analizadas por Mann y Bidwell (1999) para Roundup® (8,1 y 32,2 mg/l). La única especie que fue más sensible a Gly, y que no se incluyó dentro de este rango fue *E. bicolor*, que presentó un valor de  $Cl_{50-24 h}$  de 5,12 mg/l. Sin embargo, es importante aclarar que *E. bicolor* no es la especie de anfibio más sensible para la cual se informan efectos adversos a Gly (Howe y col., 2004; Wojtaszek y col., 2004; Relyea, 2005), ya que en un estudio realizado por Lajmanovich y col., (2003) determinaron en larvas de *S. nasicus* expuestas a Gly una toxicidad de 4,78 mg/l a las 24 h y de 3,66 mg/l a 48 h.

Al situarnos en un paisaje agrícola, lagunas inmersas o próximas a los cultivos, por lo general pequeñas y de escasa profundidad, se convierten en charcas reproductivas para los anfibios (Peltzer y Lajmanovich, 2004; Peltzer y col., 2006, Attademo, 2010; Sanchez, 2011). Estos sitios son compartimientos ambientales no-blanco para los plaguicidas, capaces de afectar a los anfibios durante su etapa de desarrollo. En este contexto, la Secretaría Nacional de Recursos Hídricos de nuestro país determinó los niveles guía de calidad de agua ambiente para la protección de la biota acuática, tomando como referencia datos publicados de toxicidad aguda y crónica de diferentes grupos taxonómicos, integrados en su gran mayoría por especies no

nativas. De este modo, se informa para el insecticida F como valor de protección para la biota acuática toda concentración inferior a 0,00022 mg/l (NGNCA, 2004b), y por debajo de 2,4 mg/l para el herbicida Gly (NGNCA, 2003), no reportando valor guía para TFS. Si bien estas concentraciones guía serían adecuadas para la protección de los organismos acuáticos desde el punto de vista toxicológico, estos rangos son inferiores a las concentraciones ambientales detectadas en los ambientes acuáticos para F (0,2 y 2,5 mg/l; Ernst y col., 1991) y para Gly (3,8 y 10,1 mg/l; Couture y col., 1995; Mann y Bidwell, 1999; Perkins y col., 2000). De esta manera, se refleja la necesidad de desarrollar nuevos estudios que provean información más adecuada sobre el potencial tóxico de los xenobióticos, capaces de establecer niveles guía de calidad de agua ambiental a partir de estimaciones realizadas con especies nativas de diversos grupos taxonómicos, generando así, las reglamentaciones apropiadas orientadas a prevenir, controlar o reducir los impactos sobre la biodiversidad regional.

En función de los resultados ecotoxicológicos obtenidos, se puede concluir también que la especie *E. bicolor* fue la que presentó una mayor sensibilidad frente a los tres plaguicidas, mientras que *T. typhonius* fue la más tolerante para F, *L. chaquensis* para Gly e *H. pulchellus* para TFS. Estos resultados demuestran que existió variabilidad interespecífica en la sensibilidad de las nueve especies de anfibios estudiadas según el tipo de agroquímico al que fueron expuestas. Estas diferencias en la sensibilidad de las especies a los tóxicos también fue observada por Jones y col. (2009) entre nueve especies de renacuajos expuestas a endosulfán, y por Relyea y Jones (2009) cuando evaluaron la toxicidad de la más conocida formulación de glifosato (Roundup®) sobre 13 especies de larvas de anfibios (ocho de anfibios anuros y cuatro de salamandras). Estos autores enfatizan en el origen filogénico de tal variabilidad, postulando que la sensibilidad podría diferir no sólo entre especies sino también entre familias de anfibios. Por su parte, Lajmanovich y col. (2010) en un estudio realizado con 11 especies de anfibios anuros de especies nativas de la llanura de inundación del río Paraná Medio, expresaron que las diferencias interespecíficas en la sensibilidad de las especies a los plaguicidas está asociada a la variabilidad en los niveles enzimáticos, específicamente en la actividad de las B-esterasas y carboxilesterasas. También, investigaciones en el área de la toxicología evolutiva, postularon que las modificaciones ambientales producidas por la contaminación de origen antrópico, son capaces de alterar, a nivel molecular, las características de varias poblaciones de una misma especie de anuros (Matson y col., 2006), así como también la tolerancia a compuestos xenobióticos (Bridges y Semlisch, 2000).

## 5.2. Exposición de depredador y presa a los plaguicidas

La exposición de los organismos, depredador y presa, a los plaguicidas F, Gly y TFS se evaluó a través de la concentración experimental más baja en la que se observan efectos adversos (LOEC), y que representa el nivel umbral de toxicidad de un producto químico (Newman y Unger, 2003). Si bien la determinación de los valores de la LOEC está directamente relacionada con el diseño del ensayo (e.g. selección de las concentraciones, número de réplicas, etc.) (Moore y Caux, 1997), varias investigaciones utilizaron esta concentración como parámetro de exposición subletal de los organismos (Kooijman y col., 1996; Fernández-Alba y col., 2002; Beketov y col., 2008; Sawasdee y Köhler, 2009; Almeida y col., 2010; Denoël y col., 2012; Oliveira y col., 2012), principalmente cuando no se dispone de datos ecotoxicológicos previos.

Durante el período de exposición de los organismos, etapa previa al inicio de los ensayos de depredación y de evaluación de respuestas etológicas y metabólicas, no se observaron efectos letales (muerte) sobre los organismos, para ninguno de los plaguicidas evaluados. Esto sugiere que, tanto la concentración de exposición (LOEC) como el tiempo establecido (6 h) garantizaron la exposición subletal de las anguilas y las larvas de anfibios.

Como consecuencia de la exposición subletal a F, las larvas de *E. bicolor* y *P. albonotatus* presentaron respuesta tardía a estímulos, natación en reversa y cola arqueada. Estos síntomas, que fueron oportunamente descritos por Salibián (1992) en larvas de *Rhinella arenarum*, así como también en muchos otros trabajos (Berrill y col., 1998; Ezemonye y col., 2007; Sumanadasa y col., 2008) son señales características del inicio de una intoxicación aguda producida por la neurotoxicidad de los insecticidas organofosforados. También, las anguilas que fueron expuestas a una concentración de 3,12 mg/l de F (LOEC de *T. typhoni*) presentaron un leve aumento de la mucosidad corporal y el cuerpo arqueado, manifestando una ligera distensión muscular. Esta pérdida de la sinuosidad en el cuerpo de las anguilas fue descrita por Sancho y col. (1998) en juveniles de anguila europea (*Anguilla anguilla*) bajo la exposición a concentraciones subletales de F (0,02 y 0,04 mg/l), aunque estos autores no observaron un incremento en la mucosidad corporal. En este sentido, Arora y Kulshrestha (1984), describieron abundante secreción de mucosidad en peces (*Channa punctatus*) expuestos a los plaguicidas carbaril y fentoato. Según estos autores, la mucosidad corporal se produjo como consecuencia de un mecanismo de defensa del organismo frente a la exposición a los plaguicidas, con el propósito de



proteger órganos vitales como las agallas. Similares hallazgos fueron descritos en peces expuestos a plaguicidas (Jiraungkoorskul y col., 2003; Ortiz y col., 2003). Por lo tanto, los dos síntomas observados en *S. marmoratus*, podrían estar relacionados con mecanismos de defensa que desarrollan las anguilas bajo alguna situación de estrés, en este caso, la exposición a una concentración subletal del insecticida F.

Es importante aclarar, que tanto en las larvas de anfibios como en las anguilas, los síntomas dejaron de observarse al transferir los organismos a agua libre de plaguicidas, luego de finalizado el período de exposición. Esto sugiere que los cambios en el comportamiento observados en depredador y presa, fueron producidos por la exposición subletal al insecticida F, indicando también que las alteraciones que preceden a la muerte resultantes de la exposición a plaguicidas son medidas más sensibles de toxicidad que la mortalidad.

### 5.3. Ensayos de depredación directa

Muchas de las especies de anuros que habitan en charcas temporarias, semipermanentes o permanentes son vulnerables a diferentes depredadores en un mismo ambiente (Skelly, 1997). Los resultados obtenidos en los ensayos de depredación demostraron que las larvas de anfibios fueron depredadas por juveniles de *S. marmoratus*. Si bien la depredación de larvas de anfibios por peces es comúnmente asociada a ambientes acuáticos semipermanentes o permanentes (Heyer y col., 1975; Hero y col., 2001; Saidapur, 2001), la capacidad de las anguilas de entrar en un proceso de semiestivación sobreviviendo varios meses enterrada en la tierra luego de la desecación de la charca (Bicudo y Johansen, 1979), le permite colonizar cuerpos de agua que se llenan en forma esporádica luego de intensas precipitaciones y pueden, por lo tanto, ser importantes depredadores de larvas de anfibios en hábitats acuáticos temporarios (Maffei y col, 2011).

Los resultados obtenidos en estas experiencias demostraron que la tasa de depredación varió entre las especies en todos los tiempos ensayados. De acuerdo con Relyea (2001a; 2001b), diversas especies de anuros responden de diferente manera ante la presencia de depredadores peces, ya sea porque los depredadores tienen distintas formas de encontrar, capturar, manipular y consumir la presa, o porque las presas exhiben una amplia variedad de rasgos para evitar el encuentro o para escapar del depredador. En nuestro caso, conocemos que *S. marmoratus* es un pez que utiliza la estrategia del tipo “*sit and wait*” (sentarse y esperar) o al acecho para la obtención de sus presas (Junges y col., 2010; 2012). Esto significa que las anguilas presentan un

comportamiento mayormente sedentario, donde las posibilidades de encuentro con la presa son menores con respecto a la de un forrajero activo, valiéndose principalmente de la visión para su localización. Por lo tanto, la variación en la tasa de depredación entre especies podría estar relacionada con características inherentes a cada una de las especies presa (e.g. modos de vida, morfología, preferencia de hábitats, etología, etc.) que le otorgan la estrategia antidepredadora para disminuir las probabilidades de detección y/o captura por parte del depredador.

En cuanto a los diferentes plaguicidas utilizados (F, Gly y TFS), podríamos esperar que alguno de ellos exacerbe o disminuya las tasas de depredación, esencialmente porque presentan diferentes mecanismos de acción tóxica, e incluso, distintos niveles de toxicidad. Sin embargo, el único caso en el que se observó una reducción de la tasa de depredación fue con TFS al finalizar los ensayos (24 h). Si bien el TFS resultó ser el plaguicida más tóxico para las larvas de anfibios, investigaciones previas demostraron que los efectos letales producidos por la exposición a TFS sólo se registraron durante las primeras 24 h de exposición (Junges y col., 2012; Hooser y col., 2012), lo cual concuerda con el tiempo de vida en el agua (entre 16,8 y 31,2 h). Por lo tanto, la reducción observada en la tasa de depredación puede deberse a una posible recuperación de las presas luego de un corto período de exposición subletal a TFS (6 h), de modo que las larvas pudieron tener más posibilidades de encontrarse con el depredador, pero a su vez, mayores oportunidades de escape, y en consecuencia disminuyeron la vulnerabilidad a la depredación (Schmidt y Amezcuita, 2001; Strobbe y col., 2009; Van Gossum y col., 2009).

Sin dudas, una pregunta que ha intentado ser respondida a través de diversas investigaciones durante los últimos años, es si la exposición subletal a plaguicidas altera la interacción depredador-presa. En respuesta a este planteo, la mayoría de los trabajos realizados hasta el momento encontraron que la exposición a plaguicidas modifica la interacción entre depredador y presa, aumentando o disminuyendo la vulnerabilidad de las presas expuestas a la depredación. (Cooke, 1971; Bridges, 1997; Van Buskirk y McCollum, 2000; Ingermann y col., 2002; Broomhall, 2002; 2004; Campero y col., 2007; Relyea y Edwards, 2010). En concordancia con estos trabajos, los resultados de este estudio demuestran que la interacción anguila-renacuajo fue alterada por un corto tiempo de exposición subletal a los plaguicidas F, Gly y TFS, ya que la tasa de depredación varió según los tratamientos de exposición (A-R-; A+R-; A-R+; A+R+) en todos los tiempos analizados. El hecho que el tratamiento donde depredador y presa no fueron expuestos a plaguicidas (A-R-) presentó las mayores tasas de depredación, y a su vez, difirió significativamente con respecto a los restantes tratamientos, refleja claramente el impacto de los plaguicidas en la interacción.

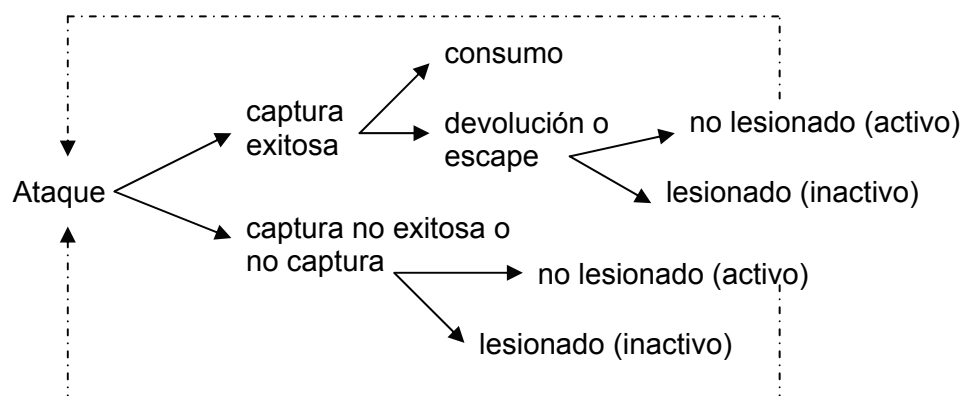
Si se analizan los resultados teniendo en cuenta que las concentraciones de exposición a los plaguicidas de la dupla depredador-presa en los animales experimentados se definieron en función de la LOEC de los renacuajos (presas), podríamos esperar que en esta interacción el depredador sea el menos afectado en términos de ecotoxicidad. Si representamos este planteo con un ejemplo concreto, se puede observar que una concentración de 2,5 mg/L de Gly (la LOEC para la especie *E. bicolor*) representa para la anguila la exposición a una concentración 47,6 veces menor que su propia LOEC (119,14 mg/l para Gly). Sin embargo, la exposición de la dupla depredador-presa a una misma concentración subletal, refleja lo que podría ocurrir en un entorno natural cuando los organismos que habitan en un ambiente acuático son expuestos a una concentración ambientalmente relevante de un plaguicida. También, podríamos esperar que los efectos producidos en el depredador por la exposición a los plaguicidas no alcancen a generar cambios reflejables en la interacción depredador-presa. En este sentido, y al considerar que los plaguicidas se aplican en pulsos y se degradan con relativa rapidez (Ashauer y col., 2006; Janssens y Stocks, 2012), para las anguilas este pulso de exposición a plaguicidas representó una disminución en la tasa de depredación, ya que anguilas expuestas consumieron menos larvas de anfibios que aquellas no expuestas durante todos los períodos de tiempo evaluados, indistintamente si los renacuajos estaban o no expuestos a los plaguicidas. Asimismo, el hecho que estas diferencias en las tasas de depredación entre anguilas expuestas y no expuestas se observaron hasta el final de los ensayos (24 h), sugiere además que los depredadores no lograron recuperarse de la exposición a los plaguicidas.

En concordancia con Clements y col. (1989) los efectos de las sustancias tóxicas sobre la interacción depredador-presa pueden ser más fáciles de comprender si el comportamiento de una de las especies (depredador o presa) se ve más afectado que el de la otra. En este sentido, Ingermann y col. (2002) demostraron que cuando los contaminantes modifican las defensas de la presa, pero no el comportamiento alimentario del depredador, la vulnerabilidad de las presas aumenta, sesgando el resultado de la interacción en favor del depredador. En nuestros ensayos, el resultado final de la interacción depredador-presa fue sesgado en favor de las larvas de anfibios expuestas a los plaguicidas, ya que fueron significativamente menos depredadas por las anguilas en todos los períodos de tiempo evaluados. Este resultado es consistente con estudios previos (Skelly, 1994; Relyea, 2001a; Relyea y Hoverman, 2008), los cuales sugieren que una reducción en la actividad de la presa inducida por los plaguicidas desempeña un papel importante en la reducción de las tasas de depredación; en otras palabras, cuando la presa reduce su actividad, las tasas de encuentro con los depredadores disminuye, y por lo tanto, se reduce el riesgo de depredación. De este modo, es probable suponer que el comportamiento de las larvas no

expuestas a los plaguicidas favoreció los encuentros con *S. marmoratus*, incrementando su vulnerabilidad ante este depredador específico. En este sentido, se conoce que un aumento en la actividad de las larvas incrementa la probabilidad de encuentro con los depredadores “*sit and wait*” (Werner y Anholt, 1993; Skelly, 1994; Teplitsky y col., 2003; Jara y Perotti, 2010). Por lo tanto, porque las anguilas se caracterizan por permanecer en una posición fija durante un período de tiempo prolongado y porque detectan visualmente a sus presas vivas a través del movimiento; es posible que las larvas al percibir la presencia del depredador intentaron alejarse de la zona de riesgo, y en lugar de disminuir su vulnerabilidad a la depredación la aumentaron. Asimismo, estos resultados también evidencian que aunque la exposición a plaguicidas puede alterar las interacciones entre depredadores y presas, no necesariamente, estas modificaciones pueden ser siempre relacionadas con un aumento en la mortalidad de los individuos por depredación (Van Buskirk y McCollum, 2000), tal como fuera comprobado oportunamente por otros autores (Boone y Semlitsch, 2001; 2002; 2003; Bridges y Boone, 2003; Boone y col., 2004; Mills and Semlitsch, 2004; Rohr y Crumrine, 2005; Relyea y col., 2005; Boone y Bridges-Britton, 2006; Mandrillon y Saglio, 2007).

#### 5.4. Monitoreo de los organismos durante los ensayos de depredación

Durante el transcurso de los ensayos de depredación directa, se observó que la depredación de larvas de anfibios por parte del depredador *S. marmoratus* puede tener dos efectos diferentes sobre las poblaciones de presas: 1) efectos de consumo, que incluyen la muerte de presas debido a la depredación, y 2) efectos de no consumo, tales como las lesiones que algunas especies de presas pueden experimentar en respuesta a los intentos de captura por parte del depredador (Figura 67).



**Figura 67:** Posibles secuencias de interacciones entre depredador y presa que pueden dar origen a los efectos de consumo y de no consumo. Tomado de Chang y Hanazato (2003).

Con respecto a los efectos de consumo, no quedan dudas que *S. marmoratus* depreda sobre las larvas de anfibios, incorporando un nuevo ítem en su dieta, nunca antes registrado en trabajos previos (Braga y col., 2008), supuestamente porque no pudieron ser reconocidos en los contenidos gastrointestinales debido al avanzado estado de digestión de los tejidos (obs. pers.) o simplemente porque no pudieron ser clasificados, formando parte del material no identificable en las clasificaciones.

Acerca de los efectos de no consumo, diferentes tipos de lesiones fueron observadas en seis de las nueve especies de larvas de anfibios como consecuencia de los intentos de captura por parte del depredador. Estas lesiones provocaron en las larvas efectos subletales y letales, con la particularidad que, aunque lesionadas, no fueron consumidas por *S. marmoratus*, lo cual estaría indicando que este depredador se alimenta sólo de presas vivas y que se encuentren en movimiento.

Si se considera que no se registró mortalidad natural o por la exposición a plaguicidas en las larvas de anfibios que se controlaron en paralelo a los ensayos de depredación, podemos afirmar que las lesiones con efectos letales cuantificadas durante los ensayos de depredación fueron provocadas por los ataques del depredador, excluyendo en este sentido la muerte de las presas por depredación (consumo).

En las larvas de anfibios que recibieron lesiones, la región del cuerpo donde se localizó la agresión fue determinante del tipo de lesión producida. Así fue, que las lesiones con efectos letales se localizaron principalmente en la región de la cabeza y el cuerpo de los renacuajos, mientras que las lesiones en la cola afectaron de manera subletal a las larvas de anfibios. Esto sugiere que durante los intentos de captura *S. marmoratus* dirige sus ataques hacia la cabeza y el cuerpo de los renacuajos, limitando las posibilidades de escape de sus presas. En un trabajo realizado por Van Buskirk y col. (2003), los autores plantean que los ataques producidos por el depredador, *Aeshna cyanea*, en la zona de la cola fueron menos peligrosos para los renacuajos que los ataques en la cabeza y el cuerpo, ya que las larvas capturadas por la cola tienen mayores oportunidades de escapar desgarrando parte de la aleta caudal (Doherty y col., 1998; Johnson y Eidietis, 2005). Quizás por esta razón no se observaron lesiones en las larvas de *Physalaemus*, ya que posiblemente no tuvieron opción de escapar frente al ataque del depredador.

Por otro lado, los resultados obtenidos no permitieron relacionar el efecto de la exposición a los plaguicidas con un incremento en el número de lesiones causadas por las

anguilas, ya que las mismas fueron producidas en la misma proporción por anguilas expuestas y no expuestas. Sin embargo, la exposición a los plaguicidas parece tener un importante impacto sobre las lesiones de efectos letales, debido a que fueron principalmente observadas en los renacuajos expuestos. Ahora bien, este resultado plantea un nuevo interrogante: *¿por qué las larvas que fueron lesionadas no fueron consumidas por el depredador?*. Tal vez, una respuesta posible puede hallarse si tenemos en cuenta que la especie que recibió mayor proporción de lesiones fue *R. arenarum*. Sólo el 27,5% de las lesiones que recibió esta especie fueron letales, mientras que 49,4% fueron subletales; con lo cual no podemos atribuir al plaguicida la responsabilidad de este comportamiento. De esta manera, la explicación podría hallarse si se considera que la presencia de sustancias repulsivas en la piel de *R. arenarum* actúan como un mecanismo defensivo para desalentar la depredación por parte de los peces (Kats y col., 1988; Werner y McPeck, 1994; Lawler y Hero, 1997; Hero y col., 2001), de modo que *S. marmoratus* es exitoso en sus eventos de captura pero por una cuestión de no palatabilidad, decide no consumirlas. Sin embargo, esta estrategia no puede ser una opción válida que justifique el no consumo de los renacuajos, ya que de lo contrario sería imposible justificar por qué *S. marmoratus* consumió larvas de *R. arenarum* durante los ensayos de depredación. Si bien está documentado que los renacuajos de *R. arenarum* pueden no ser palatables para algunos depredadores, varios trabajos reportan la palatabilidad de los mismos; entre ellos se destaca el trabajo realizado por Kehr y Scnack (1991) quienes demostraron que *Belostoma oxyurum* en estadios iniciales consume larvas de *R. arenarum*.

Por otro lado, también es conocido que las larvas que se encuentran en grupos muestran un comportamiento más arriesgado, posiblemente debido a que la presencia de un mayor número de coespecíficos diluiría el riesgo de depredación (Cresswell, 1994; Spieler, 2003; 2005; Abrahams y col., 2009) y además, los depredadores que se orientan visualmente podrían cometer más errores al intentar capturar a uno de los miembros del grupo (efecto confusión) (Whitfield, 2003). Sin embargo, cuando alguno de los miembros del grupo detecta la presencia de un depredador se produce la dispersión rápida de la agregación (Treherne y Foster, 1981) como un mecanismo de defensa, lo cual aumenta las probabilidades de error. Porque una característica de las larvas de *R. arenarum* es formar agregados larvales (Kehr, 1994a; Kehr y Marangoni, 1999), podría ocurrir que *S. marmoratus* sea atraído por el movimiento generado por la agregación, y que al intentar capturar a uno de los individuos del grupo, provoque las lesiones subletales como consecuencia del efecto confusión. Este comportamiento podría relacionarse con las lesiones observadas en la cola de las larvas, ya que las mismas pueden ser consecuencia de eventos de captura no exitosa por parte del depredador, o bien, se pudieron

originar cuando las larvas tuvieron la oportunidad de escapar al ataque de las anguilas sin ser consumidas. Por lo tanto, pudo ocurrir que, posteriormente, las presas lesionadas permanecieron inmóviles o bien redujeron su actividad, por lo cual podríamos suponer que fueron menos detectadas por el depredador; particularmente porque *S. marmoratus* prefiere alimentarse de presas vivas y que se encuentren en movimiento, tal como lo hacen la mayoría de los depredadores *sit and wait*.

### 5.5. Evaluación de respuestas etológicas

Las alteraciones en el comportamiento son consideradas como uno de los mecanismos de respuesta por medio de los cuales los organismos se adaptan a los cambios en su entorno, incluyendo la exposición a xenobióticos (Kane y col., 2005; Gerhardt, 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis concuerdan con esta afirmación, ya que todas las especies de de anfibios evaluadas alteraron su comportamiento en respuesta a la exposición subletal a los plaguicidas F, Gly y TFS. Estos resultados también indican que los dos parámetros del comportamiento que se evaluaron en las larvas de anfibios presentaron la sensibilidad necesaria para detectar cambios tempranos en el comportamiento relacionados con la exposición subletal a F, Gly y TFS.

Aunque cada especie de renacuajo presentó diferentes niveles basales de actividad natatoria como de respiración, cinco de las nueve especies (*R. arenarum*, *L. chaquensis*, *P. albonotatus*, *P. santafesinus* y *E. bicolor*) exhibieron reducciones en la actividad natatoria y en la respiración en presencia de F. Por su parte, Gly redujo la actividad natatoria y la respiración en *R. arenarum*, *P. albonotatus*, *P. santafesinus* e *H. pulchellus*, y las incrementó en las especies *L. latrans* y *T. typhonius*. Mientras que en presencia de TFS, la mayoría de las larvas (*R. arenarum*, *L. latrans*, *L. chaquensis*, *P. albonotatus* e *H. pulchellus*) disminuyó la actividad natatoria y la respiración, pero un aumento en estos parámetros fue observado en *P. riograndensis*.

Existe un gran número de investigaciones que demuestran cómo la exposición a diferentes plaguicidas altera el comportamiento de las larvas de anfibios. En dichos estudios se plantea que la respuesta más observada entre las larvas de anfibios expuestas a plaguicidas es la reducción de la actividad natatoria, incluso hasta alcanzar niveles de inmovilidad (Berril y col., 1994; Semlitsch, y col., 1995a; Bridges, 1997; 1999; Bridges y Semlitsch, 2000; Relyea y Mills, 2001; Broomhall, 2004; Punzo, 2005; Brunelli y col., 2009; Denoël y col., 2012; 2013). La reducción en la actividad natatoria inducida por plaguicidas también fue observada en otros

organismos acuáticos (Kruzynski y col., 1994; Brewer y col., 2001; Hanazato, 2001; Scott y Sloman, 2004; Almeida y col., 2010; Tu y col., 2010; Martins y col., 2012). No obstante, algunos investigadores reportaron incrementos en la actividad natatoria producto de la exposición a plaguicidas. Es así que Schriks y col. (2006) detectaron que la exposición aguda de las larvas de *Xenopus laevis* al fungicida trifeniltin provocó incrementos en la actividad natatoria cuando las larvas fueron expuestas a 1,25 µg/l. También, Relyea y Edwards (2010), a pesar de observar que la mayoría de las larvas de *Hyla versicolor*, *Rana clamitans* y *R. catesbeiana* redujeron su actividad cuando fueron expuestas a los insecticidas carbaril (0,1 mg/l) y malatión (1,0 mg/l), también notaron que las larvas de *H. versicolor* expuestas a 0,1 mg/l de carbaril aumentaron su actividad. En este caso, los autores postulan que el incremento en la actividad pudo haber sido causado por las diferencias en las respuestas fisiológicas de las especies a los plaguicidas, y al hecho de que las formulaciones comerciales contienen ingredientes inertes que podrían afectar el comportamiento de las larvas respondiendo a un mecanismo de acción especie-específico. Hasta el momento, no se conocen trabajos de investigación que contemplen la evaluación del comportamiento en larvas de anfibios expuestas a TFS. Mientras que para Gly, sólo se reportan aspectos del comportamiento de las larvas asociados con signos de toxicidad, tales como reducción de la actividad y permanencia inmóvil en el fondo del recipiente a concentraciones subletales, y natación rápida e incontrolada a concentraciones cercanas o superiores a la CL<sub>50</sub>, luego de 24 a 48 h de exposición (Bernal y col., 2009).

Aunque hay numerosas evidencias que reportan cambios en el comportamiento relacionados con la actividad natatoria de los anfibios, muy pocos trabajos registraron alteraciones en el comportamiento relacionadas con el número de veces que el renacuajo atraviesa la columna vertical de agua para tomar aire superficial. En este sentido, Denoël y col., (2012) encontraron que las larvas de *Rana temporaria* expuestas a 3, 22, y 282 µg/l de endosulfán disminuyeron el número de veces que tomaron aire atmosférico en relación a las larvas del control. Estos autores concluyeron que la menor actividad natatoria que observaron en los renacuajos como consecuencia de la exposición a endosulfán está asociada a las reducciones en la actividad respiratoria. En concordancia con estas conclusiones, los resultados obtenidos demostraron una fuerte correlación positiva entre la actividad natatoria y la respiración debido a la exposición a los tres plaguicidas, poniendo de manifiesto que la respiración es un aspecto del comportamiento asociado a la actividad natatoria de las larvas de anfibios, indicando que a mayor actividad, la demanda de oxígeno se incrementa (Wassersug y Feder, 1983; Egea-Serrano y col., 2009). En contraposición, Egea-Serrano y col. (2011) concluyeron que el estrés causado por la exposición a nitritos puede inducir un incremento en el número de veces que las larvas de



anfibios toman aire atmosférico, siempre y cuando la actividad natatoria de las larvas no se encuentre afectada, y por lo tanto fueran capaces de alcanzar la superficie del agua. Este mismo comportamiento fue observado por Denoël y col. (2012) en larvas de anfibios expuestas a 0,4 µg/l de endosulfán, por lo cual el estrés causado por la exposición a bajas concentraciones puede ser compensado con un incremento en la toma de aire atmosférico. Porque existe evidencia que sustenta que los ingredientes inertes incluidos en las formulaciones de Gly interfieren en la respiración cutánea de los anfibios anuros adultos y en la respiración branquial de los renacuajos (Tyler 1997a; 1997b; Cardellini y Ometto, 2001; Lajmanovich y col., 2003), es probable que los cambios de comportamiento observados en las larvas expuestas podrían ser una respuesta a la falta de oxígeno. Probablemente, y de acuerdo con lo observado por McIntyre y McCollum (2000), las larvas optaron por permanecer prácticamente inactivas en el fondo del recipiente tratando de compensar la hipoxia que soportaron durante el período de exposición. En este contexto, Gdovin y col. (2006) demostraron que las larvas de *Rana catesbeiana* que no tuvieron la opción de atravesar la película superficial de agua para respirar aire atmosférico presentaron una mayor mortalidad en comparación con aquellas que tuvieron la capacidad de hacerlo.

Las especies *L. chaquensis*, *P. santafesinus* y *T. typhoni* presentaron variación en el comportamiento en relación con el tiempo, manifestando en todos los casos signos de recuperación a la exposición subletal a los plaguicidas. Es decir, que las diferencias halladas fueron debidas a un aumento en la actividad natatoria y en la respiración hacia el final de los ensayos (18 y 24 h) con respecto a los valores obtenidos durante las primeras horas (1 y 6 h) posteriores a la exposición. La significancia obtenida en siete de las nueve especies de larvas de anfibios en la interacción exposición a plaguicidas con respecto al tiempo y las respuestas etológicas evaluadas, estaría indicando que la exposición crónica a plaguicidas podría afectar negativamente el comportamiento de las larvas de anfibios. Por lo tanto, es probable que tales efectos tengan la capacidad de intervenir sobre conductas de escape a los depredadores, de captura de las presas, en el reconocimiento adecuado de un depredador, así como también en la coordinación de las acciones frente a un depredador (Laurence, 1972; Plaut, 2001; Barbieri, 2007). También, Wassersug y Seibert (1975) y Noland y Ultsch (1981) sostienen que los renacuajos que por alguna razón no pueden respirar aire atmosférico, tienen pocas posibilidades de sobrevivir, principalmente si las concentraciones de oxígeno son bajas.

En los últimos años, varios estudios lograron relacionar la exposición a plaguicidas con los cambios en el comportamiento de los anfibios, y además, cómo estos cambios pueden impactar en las interacciones depredador-presa (Bridges, 1997; 1999; Relyea y Mills, 2001). Entre los estudios que contemplaron la exposición simultánea de depredador y presa a

plaguicidas, se puede citar el trabajo realizado por Broomhall (2002), quien documentó una reducción en la tasa de depredación cuando las larvas de anfibios fueron expuestas a 0,03 y 1,3 mg/l del insecticida endosulfán. También, Relyea y Hoverman (2008) expusieron a una comunidad acuática a malatión y encontraron que las tasas de depredación sobre dos especies de larvas de anfibios fueron reducidas a medida que la concentración de malatión se incrementaba, dentro de un rango de concentraciones subletales. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis estarían en concordancia con estudios previos que sugieren que los plaguicidas reducen la depredación de las larvas de anfibios, aunque ninguno de ellos identificó el o los mecanismos que intervienen en la alteración de las tasas de depredación.

Estos resultados también ponen de manifiesto la importancia de evaluar respuestas en el comportamiento vinculadas con exposiciones subletales de xenobióticos como criterio de valoración en pruebas de toxicidad, capaces de actuar como señales tempranas y no invasivas de exposición (Janssens y Stoks, 2012). Es importante destacar que las respuestas etológicas en este trabajo de tesis fueron cuantificadas mediante técnicas visuales tradicionales de análisis de video, sin embargo, la ecotoxicología del comportamiento está tomando mayor relevancia debido al avance de la tecnología. Particularmente, las nuevas posibilidades que ofrecen los programas de video-tracking o de seguimiento (e.g. Ethovision, ANY-Maze), permiten cuantificar una mayor cantidad de patrones específicos del comportamiento, como por ejemplo: velocidad media, distancia recorrida, ángulo de giro absoluto, tiempo total de inmovilidad, actividad natatoria total, uso lateral y vertical de la columna de agua, tiempo de permanencia por área, motilidad de la cola, entre otros (Widder y Bidwell, 2008; Gonçalves y col., 2011). Si bien, algunos aspectos del comportamiento de las larvas de anfibios pueden ser evaluados por medio de ambas técnicas, sería interesante analizar en futuras investigaciones, mediante la aplicación de softwares de video-tracking, nuevos parámetros etológicos con mayor grado de precisión y capaces de detectar efectos tempranos y sensibles a diversos xenobióticos bajo escenarios más realistas (Martin, 2004; Sárria y col., 2011; Denoël y col., 2013).

## **5.6. Evaluación de respuestas metabólicas**

Uno de los biomarcadores ampliamente reconocido para cuantificar la interacción de los xenobióticos y su impacto sobre los organismos, es la evaluación de las respuestas metabólicas, entre ellas el monitoreo de las enzimas colinesterasas (Sánchez-Hernández, 2006; Lajmanovich y col., 2011).

Los resultados de este trabajo de tesis permitieron demostrar que un corto período de exposición (6 h) a concentraciones subletales de los plaguicidas F, Gly y TFS provocó la alteración de los niveles normales de las actividades enzimáticas en las nueve especies de las larvas de anfibios. La inhibición de la actividad enzimática, respecto de los controles, fue la respuesta mayormente observada entre las especies debido a la exposición a plaguicidas, aunque no siempre estas inhibiciones fueron estadísticamente significativas. Este comportamiento fue registrado de manera significativa en cinco de las especies para la AChE (máximo valor de inhibición de 47,7%) y en siete especies para la BChE (máximo valor de inhibición de 78,3%) debido a la exposición a F. En respuesta a la exposición a Gly, la actividad de la AChE fue inhibida significativamente en tres de las especies (máximo valor de inhibición de 33%), mientras que la inhibición de la BChE sólo fue registrada en dos especies (máximo valor de inhibición de 62,4%). Por último, TFS inhibió la actividad de la AChE en dos de las especies (máximo valor de inhibición de 40%) y de la BChE en cuatro especies (máximo valor de inhibición de 34%).

Como puede observarse, la BChE presentó mayores niveles de inhibición que la AChE, demostrando que esta enzima es más sensible como biomarcador que la AChE (Sánchez-Hernández, 2006). Similares resultados fueron observados en peces (Sturm y col., 1999; Chuiko, 2000), aves (Thompson y col., 1991; Martínez-Haro y col., 2007), mamíferos (Ecobichon y Comeau, 1973) y reptiles (Sánchez-Hernández y col., 1997; 2004b), como también en los anfibios (Sparling y col., 1997; Lajmanovich y col., 2009). Algunos autores, como por ejemplo Wogran y col. (2001), justifican que la menor sensibilidad de la AChE, comparada con la BChE, puede deberse a que es necesaria la exposición de los organismos a altas concentraciones de xenobióticos para producir la disminución de la actividad de la AChE. Porque la inhibición de las colinesterasas es considerada como un mecanismo de detoxificación en los organismos (Sánchez-Hernández, 2007), y particularmente, porque se conoce que la BChE absorbe y degrada los compuestos organofosforados antes de que actúen sobre el sistema nervioso (Russell y Overstreet, 1987; Saxena y col., 2006); podríamos suponer que la mayor sensibilidad de la BChE muscular frente a la AChE, tras una exposición a plaguicidas, está relacionada con un efecto protector de esta enzima sobre la actividad de la AChE, efecto que se traduce, por lo tanto, en un mayor nivel de inhibición de la BChE.

Acorde a lo esperado, F provocó la inhibición de las enzimas AChE y BChE, debido a que es un reconocido insecticida organofosforado inhibidor de las colinesterasas, (Guilhermino y col., 1998; Lajmanovich y col., 2009; Almeida y col., 2010). En los últimos años, se puso en evidencia que varios otros compuestos, entre ellos el glifosato, pueden también inhibir las

colinesterasas (Modesto y Martínez, 2010; Lajmanovich y col., 2011; Ruamthum y col., 2011; Menéndez-Helman y col., 2012). En este trabajo de tesis, las larvas de anfibios que fueron expuestas a la formulación comercial de Gly (Roundup® UltraMax), no sólo presentaron inhibición de las colinesterasas (AChE y BChE), sino que también se observó la inducción en la actividad de la AChE en las especies *R. arenarum* (19%) y *L. chaquensis* (57,5%). La misma respuesta fue observada en larvas de *T. typhonius* y *L. chaquensis* debido a la exposición a TFS, en las que el incremento en la actividad de la AChE fue del 30% y 50,6% respectivamente. Resultados similares fueron observados por varios autores (Flammarion y col., 2002; Romani y col., 2005; Gagnaire y col., 2008; Xuereb y col., 2009; Brodeur y col., 2011), aunque debido a exposiciones subletales de compuestos organofosforados. Si bien el herbicida Gly es considerado como un organofosforado débil, todavía existe mucha controversia con respecto a su mecanismo de acción, principalmente porque en un estudio realizado por Glusczak y col. (2007) se sugiere que la alteración observada en los niveles de AChE no fue causada por glifosato como ingrediente activo, sino que los efectos fueron atribuidos a los ingredientes inertes de las formulaciones comerciales. En este último caso, y debido a la discrepancia entre los estudios sobre los efectos del glifosato en lo que respecta a la inhibición de las colinesterasas, Modesto y Martínez (2010) consideran que todavía se necesita más evidencia científica que permita comprobar si los efectos observados responden al ingrediente activo o a los ingredientes inertes no declarados en las formulaciones comerciales. Con respecto a TFS, se desconoce por completo sus efectos sobre la actividad de las enzimas colinesterasas, siendo los resultados aquí presentados los primeros registros de inhibición e inducción en los niveles basales de AChE y BChE en larvas de anfibios expuestas a concentraciones subletales. Sin embargo, y en concordancia con Modesto y Martínez (2010), numerosas investigaciones son necesarias para comprender por qué estos plaguicidas que no tienen a la vía colinérgica como principal mecanismo de acción, inhiben e inducen, en algunos casos, las colinesterasas.

Con respecto al tiempo, los niveles enzimáticos de la mayoría de las especies de anfibios variaron significativamente, salvo en *R. arenarum* y *P. santafecinus*, en las que las diferencias entre los tiempos analizados (1, 6, 18 y 24 h) se mantuvieron relativamente constantes. La actividad de la BChE varió en más oportunidades que la actividad de la AChE en función del tiempo, aunque sólo en las especies *P. albonotatus*, *H. pulchellus* y *E. bicolor* se pudo observar una recuperación en los niveles basales de BChE, entendiéndose por recuperación al incremento significativo en la actividad enzimática en función del tiempo transcurrido tras el cese de la exposición a los plaguicidas. Más concretamente, a 1 h los niveles de BChE se encontraban inhibidos y a las 18 h y/o 24 h, significativamente aumentados. El mismo comportamiento fue

observado para las especies *H. pulchellus* y *E. bicolor* pero con respecto a la actividad de la AChE. En las restantes especies (*L. latrans*, *L. chaquensis*, *P. riograndensis* y *T. typhoni*), los niveles enzimáticos presentaron ascensos y descensos relativamente cíclicos durante el transcurso de los ensayos, pero que no llegaron a recuperarse a las 24 h, ya que en ese momento las enzimas manifestaban estar aún inhibidas. En este sentido, Rault y col. (2008) sostienen que los niveles de colinesterasas en los organismos, aunque expuestos a los plaguicidas, pueden tardar algún tiempo en responder a la exposición, y en algunos casos, la actividad puede recuperarse rápidamente después del período de exposición, restringiendo su límite de detección. Sin embargo, estas situaciones varían dependiendo de los organismos, del tiempo y la concentración de exposición, así como también del tipo de plaguicida a que fueron expuestos (Almeida y col., 2010). En este trabajo de tesis, se encontró una interacción significativa entre la exposición a plaguicidas y la duración de la exposición en la variación de los niveles enzimáticos de la AChE y BChE. Por tal motivo, si ocurriera que las larvas de anfibios estén expuestas a pulsos reiterados de plaguicidas, pocas oportunidades tendrán de recuperar sus niveles enzimáticos normales, ya que muy pocas especies evidenciaron signos de recuperación luego de transcurridas 24 h posteriores a un corto período de exposición, afectando su supervivencia a largo plazo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que la actividad de las enzimas colinesterasas desempeña un rol fundamental en la fisiología de las larvas de anfibios, y que por lo tanto, cualquier alteración en sus niveles normales puede, sin dudas, alterar los comportamientos individuales de los organismos, y consecuentemente, las interacciones entre ellos. En este sentido, existe numerosa evidencia que sustenta que la inhibición de las colinesterasas está relacionada con la reducción en los niveles de actividad natatoria de los organismos (Dell’Omo y Shore, 1996; Fryday y col., 1996; Scott y Sloman, 2004; Venkateswara Rao, 2005a; 2005b; 2005c; Begum y col., 2006; Cailleaud y col., 2011). Más específicamente, Oliveira y col. (2012) hallaron que la inhibición de las enzimas colinesterasas precedió a los cambios en la actividad natatoria de *Palaemon serratus* expuesto a fenitrotion. También, Kavitha y Venkateswara Rao (2007) sustentan que la inhibición de la AChE producida por la exposición de *Gambusia affinis* a clorpirifos provocó la acumulación de acetilcolina en las uniones colinérgicas alterando la actividad natatoria. Estos autores también demostraron la existencia de una correlación positiva entre los niveles de recuperación de la AChE con los de la actividad natatoria. Si bien hasta el momento no existen trabajos de investigación que relacionen a las alteraciones metabólicas producidas por la exposición a plaguicidas con la vulnerabilidad a la depredación, lo oportunamente expuesto demuestra que

hay evidencia suficiente que permite relacionar a las alteraciones metabólicas con las etológicas, y a través de estas últimas, se puede deducir su relación con la interacción depredador-presa. Por lo tanto, y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se puede sugerir que las modificaciones en la actividad de las enzimas AChE y BChE como las alteraciones en el comportamiento (actividad natatoria y respiración) de las larvas de anfibios, no sólo permiten reflejar el efecto directo de la exposición de los renacuajos a los plaguicidas F, Gly y TFS, sino que también, demuestran cómo los plaguicidas pueden alterar indirectamente las interacciones entre los organismos, más específicamente, la relación entre las larvas de anfibios y el depredador *S. marmoratus*.

En lo que respecta a los depredadores, los niveles enzimáticos respondieron significativamente a la exposición a los plaguicidas, alterando la actividad de la AChE y la BChE. Cuando las anguilas fueron expuestas a las concentraciones más bajas de cada plaguicida (F = 2 mg/l, Gly = 2,5 mg/l y TFS = 0,096 mg/l), se observó que la actividad de las enzimas AChE y BChE en músculo fue inhibida significativamente con respecto al control por la exposición a F, con porcentajes de inhibición del 37,8% para la AChE y del 41,4% para la BChE, niveles que al finalizar los ensayos (24 h) recuperaron los valores normales, indicando que el efecto puede ser reversible a corto plazo. Mientras tanto, la exposición de *S. marmoratus* a las concentraciones más altas de cada plaguicida (F = 3,12 mg/l, Gly = 21,5 mg/l y TFS = 0,66 mg/l) también alteró los niveles de las colinesterasas. En estos casos, F provocó la inhibición de las enzimas AChE (62,12%) y BChE (42,8%), mientras que en contraposición, Gly ocasionó la inducción en los niveles de AChE (51,6%) y BChE (52,4%). Estos resultados ponen de manifiesto que, a medida que se incrementa la concentración de exposición de las anguilas a los plaguicidas F y Gly, más se alteran los valores normales de las colinesterasas. En el caso del fungicida TFS, los niveles enzimáticos se mostraron inducidos a ambas concentraciones de exposición, pero a diferencia de lo observado con F y Gly, los mayores porcentajes de inducción enzimática se produjeron cuando las anguilas fueron expuestas a la concentración más baja (0,096 mg/l), aunque dichos incrementos fueron no significativos con respecto al control.

Otro aspecto importante a destacar es que las anguilas expuestas a las mayores concentraciones de F y Gly no pudieron revertir los niveles de inhibición e inducción iniciales durante la fase de recuperación en agua de clorinada, puesto que, aunque transcurridas 24 h desde la exposición los niveles enzimáticos no difirieron significativamente con los observados luego de 1 h de exposición. Uno de los supuestos planteados por Wallace y Herberz (1988) sugiere que el período de recuperación es mucho más lento en peces que en mamíferos, y que el

tiempo necesario para que los peces se recuperen puede oscilar entre unos días a semanas, dependiendo de la especie involucrada y de la concentración de exposición (Zinkl y col., 1991). Por ejemplo, Fernández-Vega y col. (1998) observaron que la recuperación de la enzima AChE medida en plasma de anguilas (*Anguilla anguilla*) expuestas al herbicida carbamato tiobecarb se produjo luego de permanecer 72 h en agua limpia. Mientras que, para la misma especie pero expuesta a 0,02 mg/l de fenitrotion, Sancho y col. (1998) reportaron que la actividad de la AChE en cerebro sólo se recuperó en un 29% tras permanecer 192 h en agua libre de plaguicida.

Entre las alteraciones metabólicas más estudiadas en peces asociada con los cambios en el comportamiento, tales como aumento de la actividad natatoria o hiperactividad, se encuentra la inhibición de la AChE. Por ejemplo, Beauvais y col. (2001) encontraron que la exposición de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) a carbaril inhibió la actividad de las colinesterasas y correlacionando esta alteración con una disminución de la actividad natatoria. Beauvais y col. (2000) y Brewer y col. (2001) también encontraron una correlación entre los cambios en la velocidad de natación y la actividad de las colinesterasas provocada por la exposición a diazinón y malatión. También, Bretaud y col. (2001) hallaron un incremento de la actividad natatoria en *Carassius auratus* luego de 4 h de exposición a carbofuram, pero curiosamente, la alteración de la actividad natatoria fue observada a una concentración más baja que aquella capaz de inhibir la AChE. Sin embargo, Tierney y col. (2007) en *Oncorhynchus kisutch* expuestos a 0,6 µg/l de clorpirifos durante 96 h no observaron hiperactividad en los peces, sino una disminución de la actividad natatoria, concentración que provocó la inhibición del 77,2% de la AChE. Estos autores, al igual que Sandahl y col. (2005) y Little y col. (1990), sostienen que la exposición de los peces a cualquier compuesto anticolinesterásico, como los plaguicidas organofosforados, altera la actividad natatoria, comprometiendo comportamientos tan importantes como la alimentación, la migración y la susceptibilidad a la depredación (Brown y col., 1985; Carlson y col., 1998; Scholz y col., 2000). En este sentido, cuando la exposición a plaguicidas produce hiperactividad, Beauvais y col. (2000) y (2001) asociaron este comportamiento de los peces con una mayor tasa de depredación; ya que estos peces al permanecer más activos fueron más depredados. Por lo tanto, y en función de los resultados obtenidos, es probable que las alteraciones metabólicas que se observaron en *S. marmoratus* tras la exposición a los plaguicidas F, Gly y TFS provoquen modificaciones en el comportamiento de las anguilas, capaces de afectar la detección y/o captura de las larvas de anfibios. Además, porque en el tratamiento donde depredador y presas fueron simultáneamente expuestos a los plaguicidas(A+R+) presentó las menores tasas de depredación se sugiere que los plaguicidas

afectan a las presas y también a los depredadores, modificando el resultado final de dicha interacción biológica.

### 5.7. Evaluación interespecífica de las variables analizadas

La comunidad larval de anuros del valle de inundación del río Paraná Medio es altamente vulnerable a diferentes depredadores acuáticos, cuya presencia en las lagunas está asociada al fenómeno pulsátil del río. Por tal motivo, las especies pueden exhibir una amplia variedad de rasgos (de comportamiento, morfológicos, fisiológicos, de crecimiento, desarrollo o supervivencia) para evitar el encuentro o para escapar del depredador (Relyea, 2001a; 2001b). Por lo tanto, la supervivencia de las poblaciones de larvas de anfibios en estos sitios, depende en gran medida de las características propias de las especies que las hacen más o menos vulnerables a la depredación.

El análisis que integró características morfológicas, de ecotoxicidad y variables de respuesta a la depredación, etológicas y metabólicas bajo la exposición a los plaguicidas, demostró la existencia de asociaciones claras entre las especies. En este sentido, se pudo observar que *E. bicolor* fue la especie que presentó una gran disimilitud con respecto a las demás especies consideradas, principalmente bajo la exposición a F y Gly. Es probable, que esta diferencia pueda deberse a una característica morfoestructural importante de esta especie, como lo es la ausencia de queratodontes (hileras de denticulos córneos que rodean la boca), lo cual hace que en sus hábitos ecológicos tenga requerimientos específicos, diferentes a los de las restantes especies (Lajmanovich, 2000). Sin embargo, bajo la exposición a Gly, *E. bicolor* se ubicó dentro del agrupamiento conformado por las tres especies de *Physalaemus* y con *R. arenarum*, todas ellas con hábitos bentónicos al igual que *E. bicolor* (Altig y Johnston, 1989; Altig y McDiarmid, 1999a; 1999b). Por lo tanto, esta característica podría indicar que la asociación de *E. bicolor* con este grupo de especies estuvo relacionado con las preferencias en el uso del microhábitat (Van Buskirk, 2002).

Otro de los agrupamientos que fue observado en los tres fenogramas analizados fue el conformado por las especies *T. typhoni*, *H. pulchellus* y *L. latrans*. Estas especies, a pesar de no estar emparentadas filogenéticamente, reúnen características morfoestructurales semejantes; es decir, son larvas de natación más activa, con aletas caudales desarrolladas, ojos laterales y forma hidrodinámica. Estas características responden también a los hábitos bentónico-nectónico de las larvas de *H. pulchellus* y *L. latrans* (Lajmanovich, 2000; Peltzer y Lajmanovich, 2007) y nectónico de *T. typhoni* (Peltzer y Lajmanovich, 2007).



Es importante destacar que las tres especies de *Physalaemus* (*P. albonotatus*, *P. santafecinus* y *P. riograndensis*) se reunieron en un mismo grupo en todos los fenogramas analizados, poniendo de manifiesto que las asociaciones entre estas especies estaría regulada especialmente por factores filogenéticos (Vera Candioti y Altig, 2010; Vera Candioti y col., 2011).

Bajo la exposición a TFS, el correspondiente fenograma mostró que *R. arenarum* y *L. chaquensis* estuvieron fuertemente asociadas. Sin embargo, esta asociación no fue tan contundente cuando estuvieron expuestas a F, y menos aún bajo la exposición a Gly, ya que *L. chaquensis* conformó un grupo totalmente aislado de las restantes ocho especies. Esta gran disimilitud hallada en *L. chaquensis* cuando estuvo expuesta a Gly, responde principalmente a factores de origen externo (Perry y Pianka, 1997), que modificaron las respuestas de esta especie. Es decir, que la exposición de *L. chaquensis* a Gly hizo que esta especie fuera la más depredada, la que presentó altos niveles de actividad natatoria, un mayor requerimiento de oxígeno atmosférico. Es importante señalar que esta especie fue la más tolerante a Gly, es decir la que presentó la mayor concentración de exposición (LOEC = 21,5 mg/l) de todas las larvas de anfibios consideradas.

Las tendencias observadas en las asociaciones interespecíficas en función de variables morfológicas, ecotoxicológicas, metabólicas, etológicas y de depredación frente a la exposición a plaguicidas, estarían indicando que las especies desarrollan diferentes respuestas para evitar ser depredadas, lo que sería explicado no sólo por factores de origen externo (e.g.: riesgo de depredación durante el forrajeo, interacciones sociales como la competencia, estructura del hábitat) o interno (e.g.: preferencias alimentarias y de hábitats, modos de vida, requerimientos de determinados nutrientes, experiencias aprendidas, toxinas), sino también por relaciones evolutivas (filogenéticos) (Perry y Pianka, 1997). Por lo tanto, se puede concluir que las diferentes respuestas observadas por las larvas de anfibios frente a la exposición a plaguicidas son el resultado de la acción combinada de características morfológicas, fisiológicas, etológicas y ecológicas, que actúan de manera conjunta, para maximizar su supervivencia.

Por último, la importancia que reviste el conocimiento de la bioecología de las larvas de anfibios anuros está estrechamente relacionada con la conservación de este grupo (Hoff y col., 1999; Peltzer y Lajmanovich, 2004; 2007; Vera Candioti, 2006), ya que cualquier disturbio producido en el ambiente incidiría en la supervivencia de las mismas, afectando a cada una de las especies nativas en diferente magnitud, tal como fuera observado oportunamente por Lajmanovich y col., (2010).

## 6. CONCLUSIONES

---

El presente trabajo contribuye al conocimiento sobre la sensibilidad de nueve especies de larvas de anfibios del litoral mesopotámico argentino: *Rhinella arenarum*, *Leptodactylus latrans*, *L. chaquensis*, *Physalaemus albonotatus*, *P. santafecinus*, *P. riograndensis*, *Trachycephalus typhonius*, *Hypsiboas pulchellus* y *Elachistocleis bicolor* a los plaguicidas fenitrotion, glifosato y trifloxistrobin. Esto se debe a que la información ecotoxicológica disponible para estas especies nativas era escasa o inexistente en lo que se refiere a F y Gly, y completamente desconocida para TFS al momento de realizar esta tesis.

A partir de los resultados obtenidos, se establecen las siguientes conclusiones:

- La toxicidad (CL<sub>50-24h</sub>) varió entre los agroquímicos evaluados, siendo más tóxico para las larvas de anfibios estudiadas el fungicida TFS, seguido por el insecticida F, y finalmente por el herbicida Gly.

- *E. bicolor* fue la especie que presentó mayor sensibilidad a los tres plaguicidas, mientras que *T. typhonius* fue la más tolerante a F, *L. chaquensis* a Gly e *H. pulchellus* a TFS.

- Las mayores tasas de depredación se registraron en el tratamiento donde depredador y presas no fueron expuestos (A-R-) a los plaguicidas F, Gly y TFS. La interacción depredador-presa fue sesgada en favor de las larvas de anfibios expuestas a los plaguicidas, siendo significativamente menos depredadas por las anguilas en todos los períodos de tiempo evaluados. Por lo tanto, a partir de estas conclusiones, se puede aceptar la **hipótesis 1**:

“Concentraciones subletales de plaguicidas alteran las interacciones depredador-presa entre larvas de anfibios (presas) y juveniles de *S. marmoratus* (depredador) del litoral mesopotámico argentino”

- *S. marmoratus* ocasionó lesiones con efectos letales y/o subletales en seis de las nueve especies de larvas de anfibios, principalmente expuestas a F, Gly y TFS, siendo determinante del tipo de lesión la región del cuerpo donde se localizó la agresión.

- La exposición subletal de las larvas de anfibios a los plaguicidas F, Gly y TFS alteró en todas las especies presas la actividad natatoria, la respiración y los niveles basales de las enzimas AChE y BChE. Estas modificaciones en el comportamiento y en las respuestas metabólicas hicieron que las larvas de anfibios expuestas a los plaguicidas fueran menos depredadas por *S. marmoratus*, de esta manera, se acepta la **hipótesis 2**:

*“Concentraciones subletales de plaguicidas alteran las respuestas etológicas y metabólicas de las presas, interfiriendo en las interacciones depredador-presa”*

- La exposición subletal de *S. marmoratus* a las mayores y menores concentraciones de los plaguicidas F, Gly y TFS modificó de manera significativa los niveles de las enzimas AChE y BChE en músculo en los dos tiempos ensayados (1 y 24 h). Las anguilas expuestas a los plaguicidas (A+) consumieron menos renacuajos que las anguilas no expuestas (A-). Estas evidencias permiten aceptar la **hipótesis 3**:

*“Concentraciones subletales de plaguicidas alteran las respuestas metabólicas del depredador, interfiriendo en las interacciones depredador-presas”*

- Las características morfológicas, de ecotoxicidad (LOEC) y las variables de depredación, etológicas y metabólicas de las larvas de anfibios bajo la exposición a F, Gly y TFS, permitieron establecer similitudes interespecíficas claras en las respuestas biológicas de los anuros evaluados.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abrahams, M.V.; Pink, M. y Klassen, C. (2009) *Predator avoidance encyclopedia of life sciences*. John Wiley, New York.
- Aldridge, W.N. (1953) *Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination*. *Biochem. J.* 53: 110 - 117.
- Alford, R.A. y Richards, S.J. (1999) *Global Amphibian Declines: A problem in applied ecology*. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30: 133 - 165.
- Allon, N.; Raveh, L.; Gilat, E.; Cohen, E.; Grunwald, J. y Ashani, Y. (1998) *Prophylaxis against soman inhibition toxicity in guinea pigs by pretreatment alone with human serum butyrylcholinesterase*. *Toxicol. Sci.* 43: 121 - 128.
- Almeida, J.R.; Oliveira, C.; Gravato, C. y Guilhermino, L. (2010) *Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion*. *Ecotoxicology* 19: 1369 - 1381.
- Alstyne, V. (2001) *Ability of predatory native Australian fishes to learn to avoid toxic larvae of the introduced toad *Bufo marinus**. *J. Fish Biol.* 59: 319 - 329.
- Altig, R. y Johnston, G. (1989) *Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies and habits*. *Herpetol. Monogr.* 2: 81 - 109.
- Altig, R. y McDiarmid, R.W. (1999a) *Body Plan: Development and morphology*. En: *Tadpoles. The biology of anuran larvae* (Eds.: McDiarmid, R.W. y Altig, R.), University of Chicago Press, Chicago y London, p. 24 - 51.
- Altig, R. y McDiarmid, R.W. (1999b) *Diversity. Familial and generic characterization*. En: *Tadpoles. The biology of anuran larvae* (Eds.: McDiarmid, R.W. y Altig, R.), University of Chicago Press, Chicago y London, p. 295 - 337.
- Altwegg, R. y Reyer, H.U. (2003) *Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs*. *Evolution* 57: 872 - 882.
- Amiard-Triquet, C. (2009) *Behavioral disturbances: the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research*. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15: 87 - 110.
- Anholt, B.R. y Werner, E.E. (1995) *Interaction between food availability and predation mortality mediated by adaptive behaviour*. *Ecology* 76: 2230 - 2234.

- APVMA: Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (2000) *Evaluation of the new active trifloxystrobin in the product flint fungicide*. On line: <[http://www.apvma.gov.au/registration/assessment/docs/prs\\_trifloxystrobin.pdf](http://www.apvma.gov.au/registration/assessment/docs/prs_trifloxystrobin.pdf)>
- Arora, N. y Kulshrestha, S.K. (1984) *Comparison of toxic effects of two pesticides on the testes of a freshwater teleost, Channa punctatus (Bloch)*. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 12: 435 - 441.
- Arregui, M.C.; Beldoménico, H.R.; Cassano, A.E.; Collins, P.; Gagneten, A.M.; Kleinsorge, E.C.; Lajmanovich, R.C.; Lenardón, A.; Lorenzatti, E.; Luque, E.H; Maitre, M.I.; Muñoz-de-Toro, M.; Ortega, H.H.; Peltzer, P.M.; Poletta, G.L.; Rodríguez, A.R.; Sánchez, D.; Scagnetti, J.; Simoniello, M.F.; Varayoud, J. y Zalazar, C.S. (2010) *Informe acerca del grado de toxicidad del glifosato*. Universidad Nacional del Litoral, 272 p.
- Ashauer, R.; Boxall, A. y Brown, C. (2006). *Uptake and elimination of chlorpyrifos and pentachlorophenol into the freshwater amphipod Gammarus pulex*. Arch. Environ. Con. Tox. 51: 542 - 548.
- ASIH (2004) *Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory Research, Herpetological Animal Care and Use Committee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists*. Washington DC, USA.
- Atchison, G.J.; Henry, M.G. y Sandheinrich, M.B. (1987) *Effects of metals on fish behavior: a review*. Environ. Biol. Fish 18(1): 11 - 25.
- Atkinson, D. (1985) *Toxicological properties of glyphosate*. En: *The Herbicide Glyphosate* (Eds.: Grossbard, E. y Atkinson, D.), Butterworth y Co. Ltd, Toronto, Canada, p. 127 - 133.
- Attademo, A.M. (2010) *Diversidad de Anfibios (Amphibia: Anura) en Cultivos de Soja de la Republica Argentina: Implicaciones en el Control Biológico de Plagas*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, 173 p.
- Attademo, A.M.; Cabagna-Zenkhusen, M.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Junges, C.M. y 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: 274 - 282.
- Attademo, A.M.; Peltzer, P. y Lajmanovich, R.C. (2005) *Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina*. Agr. Ecosyst. Environ. 106: 385 - 395.
- Attademo, A.M.; Peltzer, P.M. y Lajmanovich, R.C. (2004) *Nuevo caso de malformación en un ejemplar de rana (Leptodactylus ocellatus) (Amphibia: Anura) del Litoral Argentino*. Bol. Asoc. Herpetol. Española 15(1): 20 - 22.

- Attademo, A.M; Peltzer, P.M; Lajmanovich, R.C.; Cabagna, M.; Fiorenza, G. (2007) *Plasma B-esterases and Glutathione S-transferase activities in the toad Chaunus schneideri (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina*. *Ecotoxicology* 16 (8): 533 - 539.
- Azevedo-Ramos, C.; Magnusson, W.E. y Bayliss, P. (1999) *Predation as a key factor structuring tadpole assemblages in a savanna area in Central Amazonia*. *Copeia* 1999(1): 22 - 33.
- B**anerjee, K.; Ligon, A.P. y Spitteller, M. (2006) *Environmental fate of trifloxystrobin in soils of different geographical origins and photolytic degradation in water*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9479 - 9487.
- Barbieri, E. (2007) *Use of metabolism and swimming activity to evaluate the sublethal toxicity of surfactant (LAS-C12) on Mugil platanus*. *Brazil. Arch. Biol. Technol.* 50(1): 101 - 112.
- Laurence, G.C. (1972) *Comparative swimming abilities of fed and starved larval largemouth bass (Micropterus salmoides)*. *J. Fish Biol.* 4(1): 73 - 78.
- Barni, S.; Boncompagni, E.; Grosso, A.; Bertone, V.; Freitas, I.; Fasola, M.; Fenoglio, C. (2007) *Evaluation of Rana snk esculenta blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases*. *Aquat. Toxicol.* 81: 45 - 54.
- Battaglin, W.A.; Sandstrom, M.W.; Kuivila, K.M.; Kolpin, D.W. y Meyer, M.T. (2010) *Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other fungicides in US streams, 2005–2006*. *Water Air Soil Pollut.* 218: 307 - 322.
- Bayley, P.B. (1988) *Factors affecting growth rates of young tropical fishes: seasonality and density-dependence*. *Environ. Biol. Fish.* 21: 127 - 142.
- Beard, K.H.; Vogt, K.A. y Kulmatiski, A. (2002) *Top-down effects of a terrestrial frog on forest nutrient dynamics*. *Oecologia* 133: 583 - 593.
- Beauvais, S.L.; Jones, S.B.; Brewer, S.K. y Little, E.E. (2000) *Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and malathion to larval rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and their correlation with behavioral measures*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 1875 - 1880.
- Beauvais, S.L.; Jones, S.B.; Parris, J.T.; Brewer, S.K. y Little, E.E. (2001) *Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 84 - 90.
- Begon, M.; Harper, J.L. y Townsend, C.R. (1996) *Ecology*. Blackwell Science, Oxford, UK.

- Begum, G.; Venkateswara Rao, J. y Srikanth, K. (2006) *Oxidative stress and changes in locomotor behaviour and gill morphology of Gambusia affinis exposed to chromium*. Toxicol. Environ. Chem. 88: 355 - 365.
- Bejarano González, F.; Souza Casadinho, J.; Weber, J.M.; Guadarrama Zugasti, C.; Escamilla Prado, E.; Beristáin Ruiz, B.; Acosta, M.; Cárcamo, M.I. y Ramírez Muñoz, F. (2008) *El endosulfán y sus alternativas en América Latina*. Red de Acción sobre Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAPAL), 148 p.
- Beketov, M.A. y Liess, M. (2005) *Acute contamination with esfenvalerate and food limitation: Chronic effects on the mayfly, Cleon dipterum*. Environ Toxicol Chem 24: 1281 - 1286.
- Beketov, M.A.; Schäfer, R.B.; Marwitz, A.; Paschke, A. y Liess, M. (2008) *Long-term stream invertebrate community alterations induced by the insecticide thiacloprid: effect concentrations and recovery dynamics*. Sci. Total Environ. 405(1-3): 96 - 108.
- Belden, J.; McMurry, S.; Smith, L. y Reilley, P. (2010) *Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmentally relevant concentrations*. Environ. Toxicol. Chem. 29: 2477 - 2480.
- Bergström, U. y Englund, G. (2002) *Estimating predation rates in experimental systems: scale-dependent effects of aggregative behaviour*. Oikos 97: 251 - 259.
- Bernal, M.H.; Solomon, K.R. y Carrasquilla, G. (2009) *Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and cosmo-flux to larval colombian frogs. 1. Laboratory Acute Toxicity*. J. Toxicol. Env. Heal. A 72(15): 961 - 965.
- Berrill, M.; Bertram, S.; McGillivray, L.; Kolohon, M. y Pauli, B. (1994) *Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles*. Environ. Toxicol. Chem. 13: 657 - 664.
- Berrill, M.; Bertram, S.; Wilson, A.; Louis, S. y Brigham Dand Stromberg, C (1993) *Lethal and sublethal impacts of pyrethroid insecticides on amphibian embryos and tadpoles*. Environ Toxicol Chem 12: 525 - 539
- Berrill, M.; Coulson, D.; McGillivray, L. y Pauli, B. (1998) *Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians*. Environ. Toxicol. Chem. 17: 1738 - 1744.
- Berven, K.A. y Gill, D.E. (1983) *Interpreting geographic variation on life history traits*. Am. Zool. 23: 85 - 97.
- Bicudo, J.P.W. y Johansen, K. (1979) *Respiratory gas exchange in the airbreathing fish, Synbranchus mamoratus*. Env. Biol. Fish. 4(1): 55 - 64.
- Bionda L.C.; di Tada, I.E. y Lajmanovich, R.C. (2011) *Composition of amphibian assemblages in agroecosystems from the central region of Argentina*. Russ. J. Herpetol. 18 (2): 93 - 98.

- Blair, J. y Wassersug, R. J. (2000) *Variation in the pattern of predator-induced damage to tadpole tails*. Copeia 2000: 390 - 401.
- Blaustein, A.R. y Bancroft, B.A. (2007) *Amphibian population declines: evolutionary considerations*. BioScience 57: 437 - 444.
- Blaustein, A.R. y Wake, D.B. (1995) *The puzzle of declining amphibians populations*. Sci.Amer. 272: 52 - 57.
- Blaustein, A.R.; Gervasi, S.S.; Johnson, P.T.; Hoverman, J.T.; Belden, L.K.; Bradley, P.W. y Xie, G.Y. (2012) *Ecophysiology meets conservation: understanding the role of disease in amphibian population declines*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 367(1596): 1688 - 1707.
- Blaustein, A.R.; Han, B.A.; Relyea, R.A.; Johnson, P.T.; Buck, J.C.; Gervasi, S.S. y Kats, L.B. (2011) *The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses*. Ann. N. Y. Acad. Sci.1223: 108 - 119.
- Blaustein, A.R.; Wake, D.B. y Sousa, W.P. (1994) *Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions*. Biol. Conserv. 8: 60 - 71.
- Bonetto, A.A.; Cordiviola de Yuan, E.; Pignalberi, C. y Oliveros, O. (1969) *Ciclos hidrológicos del río Paraná y las poblaciones de peces contenidas en las cuencas temporarias de su valle de inundación*. Physis (B) 29: 213 - 223.
- Boone, M.D. (2008) *Examining the single and interactive effects of three insecticides on amphibian metamorphosis*. Environ. Toxicol. Chem. 27: 1561 - 1568.
- Boone, M.D. y Bridges, C.M. (2003) *Effects of carbaryl on green frog (*Rana clamitans*) tadpoles: timing of exposure versus multiple exposures*. Environ. Toxicol. Chem. 22: 2695 - 2702.
- Boone, M.D. y Bridges-Britton, C.M. (2006) *Examining multiple sublethal contaminants on the gray treefrog (*Hyla versicolor*): effects of an insecticide, herbicide, and fertilizer*. Environ. Toxicol. Chem. 25: 3261 - 3265.
- Boone, M.D. y Semlitsch, R.D. (2001) *Interactions of an insecticide with larval density and predation in experimental amphibian communities*. Conserv. Biol. 15: 228 - 238.
- Boone, M.D. y Semlitsch, R.D. (2002) *Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities*. Ecol. Appl. 12: 307 - 316.
- Boone, M.D. y Semlitsch, R.D. (2003) *Interactions of bullfrog tadpole predators and an insecticide: predation release and facilitation*. Oecologia 137: 610 - 616.



- Boone, M.D.; Semlitsch, R.D.; Fairchild, J.F. y Rothermel, B.B. (2004). *Effects of an insecticide on amphibians in large-scale experimental ponds*. Ecol. Appl. 14: 68 - 691.
- Bosch, B.; Mañas, F.; Gorla, N. y Aiassa, D. (2011) *Micronucleus test in post metamorphic Odontophrynus cordobae and Rhinella arenarum (Amphibia: Anura) for environmental monitoring*. J. Toxicol. Environ. Health Sci. 3(6): 155 - 163.
- Braga, A.L.C.; Pompeu, P.S.; Carvalho, R.F. y Ferreira, R.F. (2008) *Dieta e crescimento de Synbranchus marmoratus (Bloch, 1975) (Pisces, Synbranchiformes) durante período de pré-estivação em uma lagoa marginal da bacia do São Francisco, Minas Gerais*. Rev. Bras. Zoociênc. 10(2): 133 - 138.
- Brewer, S.K.; Little, E.E.; DeLonay, A.J.; Beauvais, S.L.; Jones, S.B. y Ethersieck, M.R. (2001) *Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals*. Arch. Environ. Con.Tox. 40: 70 - 76.
- Bridarolli, M.E. y Di Tada, I.E. (1994) *Biogeografía de los anfibios anuros de la región central de la República Argentina*. Cuad. Herpetol. 8(1): 63 - 82.
- Bridges, C.M. (1997) *Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl*. Environ. Toxicol. Chem. 16: 1935 - 1939.
- Bridges, C.M. (1999) *Predator-prey interactions between two amphibian species: effects of insecticide exposure*. Aquat. Ecol. 33: 205 - 211.
- Bridges, C.M. y Boone, M.D. (2003) *The interactive effects of UV-B and insecticide exposure on tadpole survival, growth and development*. Biol. Conserv. 113: 49 - 54.
- Bridges, C.M. y Semlitsch, R.D. (2000) *Variation in Pesticide Tolerance of Tadpoles among and within Species of Ranidae and Patterns of Amphibian Decline*. Conservation Biology, 14(5): 1490 - 1499.
- Brimijoin, S. (1983) *Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics*. Prog. Neurobiol. 21: 291 - 322.
- Britski, H.A.; Silimon, K.Z. y Lopes, B.S. (1999) *Peixes do Pantanal: manual de identificação*. Embrapa-SPI, Brasília/Embrapa-CPAP, Corumba.
- Brodeur, J.C.; Suarez, R.P.; Natale, G.S.; Ronco, A.E. y Zaccagnini, M.E. (2011) *Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas*. Ecotox. Environ. Saf. 74(5): 1370 - 1380.
- Brönmark, C.; Rundle, S.D. y Erlandsson, A. (1991) *Interactions between freshwater snails and tadpoles: competition and facilitation*. Oecologia 87: 8 - 18.

- Broomhall, S. (2002) *The effects of endosulfan and variable water temperature on survivorship and subsequent vulnerability to predation in Litoria citropia tadpoles*. Aquat. Toxicol. 61: 243 - 250.
- Broomhall, S.D. (2004) *Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog*. J. Appl. Ecol. 41: 105 - 113.
- Broomhall, S.D. (2005) *Measuring chemical impacts on amphibians: ecotoxicity and behavioural data in governmental regulation*. Appl. Herpetol. 2: 259 - 285.
- Brown, A.; Martínez Ortiz, U.; Acerbi, M. y J. Corchera (eds) (2006) *La Situación Ambiental Argentina 2005*. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, Argentina. 587 p.
- Brown, J.A.; Johansen, P.H.; Colgan, P.W. y Mathers, R.A. (1985) *Changes in the predator avoidance behaviour of juvenile guppies (Poecilia reticulata) exposed to pentachlorophenol*. Can. J. Zool. 63: 2001 - 2005.
- Brunelli, E.; Bernabo, I.; Berg, C.; Lundstedt-Enkel, K.; Bonacci, A. y Tripepsi, S. (2009) *Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in Bufo bufo tadpoles*. Aquat. Toxicol. 91: 135 - 142.
- Burgett, A.A.; Wright, C.D.; Smith, G.R.; Fortune, D.T. y Johnson, S.L. (2007) *Impact of ammonium nitrate on wood frog (Rana sylvatica) tadpoles: effects on survivorship and behavior*. Herpetol. Conserv. Biol. 2: 29 - 34.
- Burkart, R.; Bárbaro, N.; Sánchez, R.O. y Gómez, D.A. (1999) *Eco-Regiones de la Argentina*. APN-Prodia, Buenos Aires, Argentina.
- Burlibaşa, L. y Gavrilă, L. (2011) *Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity*. Appl. Ecol. Env. Res. 9(1): 1 - 15.
- C**abagna, M.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Attademo, M.; Ale, E. (2006) *Induction of micronucleus in tadpoles of Odontophrynus americanus (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin*. Toxicol. Environ. Chem. 88 (4): 729 - 737.
- Cabagna-Zenklusen, M.C. (2012) *Caracterización hematológica de especies de anfibios anuros con distribución en los ecosistemas del litoral fluvial argentino (provincias de Entre Ríos y Santa Fe). Potencialidad de su utilización como biomarcadores*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. 251 p.
- Cailleaud, K.; Michalec, F.; Forget-Leray, J.; Budzinski, H.; Hwang, J.; Schmitt, F.G. y Souissi, S. (2011) *Changes in the swimming behavior of Eurytemora affinis (Copepoda, Calanoida) in response to a sub-lethal exposure to nonylphenols*. Aquat. Toxicol. 102: 228 - 231.

- Campero, M.; Slos, S.; Ollevier, F. y Stoks, R. (2007) *Sublethal pesticide concentrations and predation jointly shape life history: behavioral and physiological mechanisms*. Ecol. Appl. 17: 2111 - 2122.
- Cardellini, P. y Ometto, L. (2001) *Teratogenic and toxic effects of alcohol ethoxylate and alcohol ethoxy sulfate surfactants on *Xenopus laevis* embryos and tadpoles*. Ecotox. Environ. Saf. 48: 170 - 177.
- Carlson, R.W.; Bradbury, S.P.; Drummond, R.A. y Hammermeister, D.E. (1998) *Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals*. Aquat. Toxicol. 43: 51 – 68.
- CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes Argentina. (2007) *Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina*. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Tomo II. Buenos Aires, Argentina.
- CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes Argentina. (2010) *Acerca del Glifosato. Defienden el uso del herbicida Glifosato para la producción*. Disponible en: <http://www.casafe.org/blog/?tag=glifosato>.
- Casciotta, J.R.; Almirón, A.E.; Cione, A.L. y Azpelicueta, M.M. (1999) *Brazilian freshwater assemblages from southern pampean area, Argentina*. Biogeographica 75: 67 - 78.
- Casco, V.H.; Izaguirre, M.F.; Marín, L.; Vergara, M.N.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M. y Peralta Soler, A. (2006) *Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin*. Cell. Biol.Toxicol. 22: 199 - 211.
- Cauble, K. y Wagner, R.S. (2005) *Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development*. B. Environ. Contam. Tox. 75: 429 - 435.
- Cei, J.M. (1980) *Amphibians of Argentina*. Monit. Zool. Ital. 2: 609 p.
- Cei, J.M. (1987) *Additional notes to "Amphibians of Argentina" an update, 1980-1986*. Monit. Zool. Ital. 21: 209 - 272.
- Chanda, A.; Khetan, S.K.; Banerjee, D.; Ghosh, A. y Collins, T.J. (2006) *Total degradation of fenitrothion and other organophosphorus pesticides by catalytic oxidation employing Fe-TAML peroxide activators*. J. Am. Chem. Soc. 128(37): 12058 - 12059.
- Chang, K.H. y Hanazato, T. (2003) *Vulnerability of cladoceran species to predation by the copepod *Mesocyclops leuckarti*: laboratory observations on the behavioural interactions between predator and prey*. Fresh. Biol. 48: 476 - 484.
- Chapman, P.M. y Loehr, R.C. (2003) *Relevant environmental science*. Environ. Toxicol. Chem. 22(10): 2217 - 2218.

- Chapman, P.M., Fairbrother, A. y Brown, D. (1998) *A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment*. Environ. Toxicol. Chem. 17: 99 - 108.
- Chen, C.Y., Hathaway, K.M. y Folt, C.L. (2004) *Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands*. Environ. Toxicol. Chem. 23 (4): 823 - 831.
- Chuiko, G.M. (2000) *Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide*. Comp. Biochem. Physiol. 127 : 233 - 242.
- Clements, W.H.; Cherry, D.S. y Cairns, J. Jr (1989) *The influence of copper exposure on predator-prey interactions in aquatic insect communities*. Fresh. Biol. 21: 483 – 488.
- Cohn, J. y MacPhail, R.C. (1996) *Ethological and experimental approaches to behavior analysis: implications for ecotoxicology*. Environ. Health Perspect. 104 (Supplement 2): 299 - 305.
- Collins, J.P. (2010) *Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn*. Dis. Aquat. Organ. 92(2-3): 93 - 99.
- Collins, J.P. y Crump, M.L. (2009) *Extinction in our times: global amphibian decline*. Oxford University Press, New York, USA.
- Cooke, A.S. (1971) *Selective predation by newts on frog tadpoles treated with DDT*. Nature 229: 275 - 276.
- Cordiviola de Yuan, E. (1992) *Fish populations of lentic environments of the Paraná River*. Hydrobiologia 237: 159 - 173.
- Costa, J.R.M.A.; Mela, M.; Da Silva de Assis, H.C.; Pelletier, E.; Ferreira, M.A. y De Oliveira, C.A. (2007) *Enzymatic inhibition and morphological changes in Hoplias malabaricus from dietary exposure to lead (II) or methylmercury*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 67: 82 - 88.
- Couture, G.; Legris, J. y Langevin, R. (1995) *Evaluation des impacts du glyphosate utilise dans le milieu forestier*. Ministère des Ressources Naturelles, Direction de l'environnement forestier, Service du suivi environnemental, Charles- Bourg, Quebec, Canada, 57 p.
- Cresswell, W. (1994) *Flocking is an effective antipredation strategy in red-shanks, Tringa totanus*. Anim. Behav. 47: 433 - 442.
- Crisci, J.V. y López Armengol, M.F. (1983) *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Secret.Gral. OEA. Monog. 26. Biología: 132 p.
- D**ale, V.H.; Biddinger, G.R.; Newman, M.C.; Oris, J.T.; Suter, G.W.; Thompson, T.; Armitage, T.M.; Meyer, J.L.; Allen-King, R.M.; Burton, G.A.; Chapman, P.M.; Conquest, L.L.;

- Fernandez, I.J.; Landis, W.G.; Master, L.L.; Mitsch, W.J.; Mueller, T.C.; Rabeni, C.F.; Rodewald, A.D.; Sanders, J.G. y van Heerden, I.L. (2008) *Enhancing the ecological risk assessment process*. *Integrated Environ. Assess. Manag.* 4(3): 306 - 313.
- Dalrymple, G.H. (1988) *The herpetofauna of Long Pine Key, Everglades National Park, in relation to vegetation and hydrology*. En: *Management of Amphibians, Reptiles, and Small Mammals in North America*. (Eds.: Szaro, R.; Severson, K.E. y Patton, D.R.) U.S.D.A. Forest Service, General Technical Report RM-166, Flagstaff, Arizona, p 72 - 86.
- Dardanelli, S.; Nores, M.L. y Nores, M. (2006) *Minimum area requirements of breeding birds in fragmented woodland of Central Argentina*. *Divers. Distrib.* 12: 687 - 693.
- Davidson, C. (2004) *Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use*. *Ecol. Appl.* 14: 1892 - 1902.
- Davidson, C.; Shaffer, H.B. y Jennings, M.R. (2001) *Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses*. *Ecol. Appl.* 11: 464 - 479.
- Deb, D.; Engel, B.A.; Harbor, J.; Hahn, L.; Lim, K.J. y Zhai, T. (2010) *Investigation potential water quality impacts of fungicides used to combat soybean rust in Indiana*. *Water Air Soil Pollut.* 207: 273 - 288.
- DeForest, D.K.; Adams, W.J y Chapman, P.M. (2008) *What is an appropriate level of protection? An example considering selenium exposures by aquatic birds*. *Integrated Environ. Assess. Manag.* 4(4): 513 - 515.
- Dell'Omo, G. y Shore, R.F. (1996) *Behavioral and physiological effects of acute and sublethal exposure to demethoate on wood mice, Apodemus sylvaticus [I-laboratory studies]*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 91 - 97.
- Denoël, M.; Bichot, M.; Ficetola, G.F.; Delcourt, J.; Ylief, M.Y.; Kestemont, P. y Poncin, P. (2010) *Cumulative effects of a road de-icing salt on amphibian behavior*. *Aquat. Toxicol.* 99: 275 - 280.
- Denoël, M.; D'Hooghe, B.; Ficetola, G.F.; Brasseur, C.; De Pauw, E.; Thomé, J.P. y Kestemont, P. (2012) *Using sets of behavioral biomarkers to assess short-term effects of pesticide: a study case with endosulfan on frog tadpoles*. *Ecotoxicology* 21: 1240 - 1250.
- Denoël, M.; Libon, S.; Kestemont, P.; Brasseur, C.; Focant, J.-F. y 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.
- Diamantino, T.C.; Almeida, E.; Soares, A.M.V.M.; Guilhermino, L. (2003) *Characterization of cholinesterases from Daphnia magna Straus and their inhibition by zinc*. *B. Environ. Contam. Tox.* 71: 219 - 225.

- Doherty, P.A.; Wassersug, R.J. y Lee, J.M. (1998) *Mechanical properties of the tadpole tail fin*. J. Exp. Biol. 201: 2691 - 2699.
- Drago, E.C. (1989) *Morphological and hydrological characteristics of the floodplain ponds of the Middle Paraná River (Argentina)*. Rev. Hydrobiol. Trop. 22(3): 183 - 190.
- Duré, M.I.; Kehr, A.I.; Schaefer, E.F. y Marangoni, F. (2008) *Diversity of amphibians in rice fields from northeastern Argentina*. Interciencia 33(7): 523 - 527.
- E**cheverría, D.D.; Volpedo, A.V. y Mascitti, V.I. (2007) *Diets of tadpoles from a pond in Iguazú National Park, Argentina*. Gayana 71: 8 - 14.
- Ecobichon, D.J. y Comeau, A.M. (1973) *Pseudocholinesterases of mammalian plasma: physiochemical properties and organophosphate inhibition in eleven species*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 24: 92 - 100.
- Edwards, T.M.; McCoy, K.A.; Barbeau, T.; McCoy, M.W.; Thro, J.M. y Guillette, L.J. (2006) *Environmental context determines nitrate toxicity in southern toad (Bufo terrestris) tadpoles*. Aquat. Toxicol. 78: 50 - 58.
- Egea-Serrano, A.; Tejedó, M. y Torralva, M. (2009) *Populational divergence in the impact of three nitrogenous compounds and their combination on larvae of the frog Pelophylax perezi (Seoane, 1985)*. Chemosphere 76: 869 - 877.
- Egea-Serrano, A.; Tejedó, M. y Torralva, M. (2011) *Behavioral responses of the Iberian waterfrog, Pelophylax perezi (Seoane, 1885), to three nitrogenous compounds in laboratory conditions*. Ecotoxicology 20(6): 1246 - 1257.
- Eissa, B.L.; Salibián, A.; Ferrari, L.; Porta, P. y Borgnia, M. (2003) *Evaluación toxicológica no invasiva del Cadmio: modificaciones de biomarcadores conductuales en Cyprinus carpio*. Biología Acuática 20: 56 - 62.
- Ellman, L.; Courtney, K.D.; Andreas Jr., V.; Featherstone, R.M. (1961) *A new rapid colorimetric determination of cholinesterase activity*. Biochem. Pharmacol. 7: 88 - 95.
- Ernst, W.; Julien, G. y Hennigar, P. (1991) *Contamination of ponds by fenitrothion during forest spraying*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 46: 815 - 821.
- Ezemonye, L. y Tongo, I. (2010) *Acute toxic effects of endosulfan and diazinon pesticides on adult amphibians (Bufo regularis)*. J. Environ. Chem. Ecotoxicol. 2(5): 73 - 78.
- Ezemonye, L.; Iliche, I. y Length, F. (2007) *Acute and chronic effects of organophosphate pesticides (Basudin) to amphibian tadpoles (Ptychadena bibroni)*. Afr. J. Biotechnol. 6(13): 1554 - 1558.

- Fairchild, W.L.; Ernst, W.R. y Mallet, V.N. (1989) *Fenitrothion effects on aquatic organisms*. En: *Environmental effects of fenitrothion use in forestry*. (Eds.: Ernst, W.R.; Pearce, P.A. y Pollock, T.L.), Environment Canada, Dartmouth, p. 109 - 166.
- FAO/WHO (2010) *Joint Meeting on Pesticide Specifications (JMPS). Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides*. Second Revision. Disponible en [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/PestSpecsManual2010.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/PestSpecsManual2010.pdf).
- Fawell, J.K. y Hedgecote, S. (1996) *Derivation of acceptable concentrations for the protection of aquatic organisms*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2: 115 - 120.
- Fellers, G.M.; McConnell, L.L.; Pratt, D. y Datta, S. (2004) *Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada Mountains of California, USA*. Environ. Toxicol. Chem. 23(9): 2170 - 2177.
- Feng, J.C.; Thompson, D.G. y Reynolds, P.E. (1990) *Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. Aquatic residues and off-target deposit assessment*. J. Agr. Food Chem. 38: 1110 - 1118.
- Fernández-Alba, A.R.; Hernando, M.D.; Piedra, L. y Chist, Y. (2002) *Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays*. Anal. Chim. Acta 456: 303 - 312.
- Fernández-Vega, C.; Sancho, E.; Ferrando, M.D. y Andreu, E. (1999) *Thiobencarb toxicity and plasma AChE inhibition in the european eel*. J. Environ. Sci. Health B 34: 61 - 73.
- Ferrando, M.D. y Andreu-Moliner, E. (1993) *Feeding behavior as an index of copper stress in *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus**. Comp. Biochem. Physiol. C 106: 327 - 331.
- Ferrari, A.; Lascano, C.; Pechen de D'Angelo, A. M. y Venturino, A. (2011) *Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes*. Comp. Biochem. Phys. C 153(1): 34 - 39.
- Flammarion, P.; Noury, P. y Garric, J. (2002) *The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): The fish length should not be ignored*. Environ. Pollut. 120: 325 - 332.
- Folmar, L.C.; Sanders, H.O. y Julin, A.M. (1979) *Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 8: 269 - 278.

- Fordham, C.L.; Tessari, J.D.; Ramsdell, H.S. y Keefe, T.J. (2001) *Effects of malathion on survival, growth, development, and equilibrium posture of bullfrog tadpoles (Rana catesbeiana)*. Environ. Toxicol. Chem. 20: 179 - 184.
- Forson, D. y Storfer, A. (2006) *Effects of atrazine and iridovirus infection on survival and life-history traits of the long-toed salamander (Ambystoma macrodactylum)*. Environ. Toxicol. Chem. 25: 168 - 173.
- Fossi, M.C. y Leonzio, C. (1994) *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Lewis Publishers, CRC Press, USA. 345 p.
- Franz, J.E.; Mao, M.K. y Sikorski, J.A. (1997) *Glyphosate's molecular mode of action*. En: *Glyphosate: a unique global herbicide*, ACS Monograph No. 189, Am. Chem. Soc. (ACS), Washington, DC, p 521 - 615.
- Frasco, M.F.; Fournier, D.; Carvalho, F. y Guilhermino, L. (2006) *Cholinesterase from the common prawn (Palaemon serratus) eyes: catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds*. Aquat. Toxicol. 77: 412 - 421.
- Frost, D.R. (2011) *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.5 (31 de Enero de 2011), Am. Mus. Nat. Hist., New York, USA. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>
- Frost, D.R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.H.; Haas, A.; Haddad, C.F.B.; De Sá, R.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S.C.; Raxworthy, C.J.; Campbell, J.A.; Blotto, B.L.; Moler, P.; Drewes, R.C.; Nussbaum, R.A.; Lynch, J.D.; Green, D.M. y Wheeler, W.C. (2006) *The amphibian tree of life*. B. Am. Mus. Nat. Hist. 297: 1 - 370.
- Fryday, S.L.; Hart, A.D.M. y Langton, S.D. (1996) *Effects of exposure to an organophosphorus pesticide on the behavior and use of cover by captive starlings*. Environ. Toxicol. Chem. 15: 1590 - 1596.
- Fulan, J.A. y Almeida, S.C. (2010) *Effect of the spatial heterogeneity on the predation of Scinax fuscovarius and Physalaemus cuvieri tadpoles by Odonata larvae*. Acta Sci. Biol. Sciences 32(2): 121 - 124.
- G**agnaire, B.; Geffard, O.; Xuereb, B.; Margoum, C. y Garric, J. (2008) *Cholinesterase activities as potential biomarkers: Characterization in two freshwater snails, Potamopyrgus antipodarum (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and Valvata piscinalis (Mollusca, Valvatidae, Muller 1774)*. Chemosphere 71: 3 - 560.
- Gasparri, N.I. y Grau, H.R. (2009) *Deforestation and fragmentation of Chaco dry forest in NW Argentina (1972–2007)*. Forest Ecol. Manage. 258: 913 - 921.



- Gavier-Pizarro, G.I.; Calamari, N.C.; Thompson, J.J.; Canavelli, S.B.; Solari, L.M.; Decarre, J.; Goijman, A.P.; Suarez, R.P.; Bernardos, J.N. y Zaccagnini, M.E. (2011) *Expansion and intensification of row crop agriculture in the Pampas and Espinal of Argentina can reduce ecosystem service provision by changing avian density*. *Agric. Ecosyst. Environ.* (154): 44 - 55.
- Gdovin, M.J.; Jackson, V.V.; Zamora, D.A. y Leiter, J.C. (2006) *Effect of prevention of lung inflation on metamorphosis and respiration in the developing bullfrog tadpole, Rana catesbeiana*. *J. Exp. Zool. A, Comp. Exp. Biol.* 305: 335 - 347.
- Gerhardt, A. (2007) *Aquatic behavioral ecotoxicology-prospects and limitations*. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 13: 481 - 491.
- Giesy, J.P.; Dobson, S. y Solomon, K.R. (2000) *Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide*. *Rev. Environ. Contamin. Toxicol.* 167: 35 - 120.
- Giri, A.; Yadav, S.S.; Giri, S y Sharma, G.D. (2012) *Effect of predator stress and malathion on tadpoles of Indian skittering frog*. *Aquat. Toxicol.* 106-107: 157 - 163.
- Girotti, S.; Maiolini, E.; Bolelli, L.; Ghini, S.; Ferri, E.; Barile, N. y Medvedeva, S. (2008) *Analytical Techniques and Bioindicators in Environmental Control: Honeybees, Mussels, Bioluminescent Bacteria: Rapid Immunoassays for Pesticide Detection*. En: *Soil Chemical Pollution, Risk Assessment, Remediation and Security* (Eds.: Simeonov, L. y Sargsyan, V.), NATO Science for Peace and Security Series, Springer, Netherlands, p. 327 - 347.
- Gisi, U.; Chin, K.M.; Knapova, G.; Küng Färber, R.; Mohr, U.; Parisi, S.; Sierotzki, H. y Steinfeld, U. (2000) *Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides*. *Crop Prot.* 19: 863 - 872.
- Gluszczak, L.; dos Santos Miron, D.; Crestani, M.; Braga da Fonseca, M.; de Araújo-Pedron, F.; Frescura Duarte, M. y Pimentel Vieira, V.L. (2006) *Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (Leporinus obtusidens)*. *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 65: 237 - 241.
- Gluszczak, L.; dos Santos Miron, D.; Moraes, B.S.; Simões, R.R.; Schetinger, M.R.; Morsch, V.M. y Loro, V.L. (2007) *Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (Rhamdia quelen)*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146: 519 - 524.
- Gonçalves, V.; Amaral, S. y Rebelo, R. (2011) *Behavioural responses of Iberian midwife toad tadpoles (Alytes cisternasii) to chemical stimulus of natural (Natrix maura and Squalius pyrenaicus) and exotic (Procambarus clarkii) predators*. *Basic Appl. Herpetol.* 25: 55 - 64.

- Gosner, K.L. (1960) *A simplified table for staging anuran embryos and larvae, with notes on identification*. Herpetologica 16: 183 - 190.
- Govindarajulu, P.P. (2008) *Literature review of impacts of glyphosate herbicide on amphibians: What risks can the silvicultural use of this herbicide pose for amphibians in B.C.* Wildlife Report 28, British Columbia Ministry of Environment, Victoria, British Columbia, Canada.
- Graham, J. y Baird, T. (1984) *The transition to air breathing in fishes. III. Effects of body size and aquatic hypoxia on the aerial gas exchange of the swamp eel *Synbranchus marmoratus**. J. Esp. Biol. 108: 357 - 375.
- Greulich, K. y Pflugmacher, S. (2003) *Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure*. Aquat. Toxicol. 65: 329 - 336.
- Guilhermino, L.; Barros, P.; Silva, M.C. y Soares, A.M.V.M. (1998) *Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate insecticides be questioned?* Biomarkers 3: 157 - 163.
- Guilhermino, L.; Lacerda, M.N.; Nogueira, A.; Soares, A.M.V.M. (2000) *In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring*. Sci. Total Envir. 247: 137 - 141.
- H**amilton, M.A.; Russo, R.C. y Thurston, R.V. (1977) *Trimmed Spearman–Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays*. Environ. Sci. Technol. 11: 714 - 719.
- Hanazato, T. (2001) *Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective*. Environ. Pollut. 112: 1 - 10.
- Hanazato, T. y Hirokawa, H. (2004) *Changes in vulnerability of *Daphnia* to an insecticide application depending on the population phase*. Freshw. Biol. 49: 402 - 409.
- Hang, S.; Rampoldi, E.A. y Negro, G.J. (2010) *Herbicide behaviour in non tillage systems*. En: *Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards*. (Ed.: Piotrowski, K.D.), Nova Science Publishers, New York, USA, p. 121 - 159.
- Hashimoto, Y. y Nishiuchi, Y. (1981) *Establishment of bioassay methods for the evaluation of acute toxicity of pesticides to aquatic organisms*. Japan. J. Pest. Sci. 6: 257 - 264.
- Hatch, A.C. y Blaustein, A.R. (2000) *Combined effects of UV-B, nitrate, and low pH reduce the survival and activity level of larval cascades frogs (*Rana cascadae*)*. Arch. Environ. Con. Tox. 39: 494 - 499.

- Hayes, T.B.; Khoury, V.; Narayan, A.; Nazir, M.; Park, A.; Brown, T.; Adame, L.; Chan, E., Buchholz, D.; Stueve, T. y Gallipeau, S. (2010) *Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (Xenopus laevis)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 4612 - 4617.
- Hellou, J. (2011) *Behavioural ecotoxicology, an ‘early warning’ signal to assess environmental quality*. Environ. Sci. Pollut. R 18: 1 - 11.
- Herkovits, J.; Perez-Coll, C.S. y Herkovits, F.D. (1996) *Ecotoxicity in the Reconquista River, province of Buenos Aires, Argentina: a preliminary study*. Environ. Health Perspect. 104(2): 186 - 189.
- Hero, J.M.; Gascon, C.; Magnusson, W.E. (1998) *Direct and indirect effects of predation on tadpole community structure in the Amazon rainforest*. Austral Ecology 23(5): 474 - 482.
- Hero, J.M.; Magnusson, W.E.; Rocha, C.F.D. y Catterall, C.P. (2001) *Antipredator defenses influence the distribution of amphibian prey species in the central Amazon rainforest*. Biotropica. 33(1): 131 - 141.
- Heugens, E.H.W.; Hendriks, A.J.; Dekker, T.; van Straalen, N.M. y Admiraal, W.A (2001) *Review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment*. Crit. Rev. Toxicol. 31: 247 - 284.
- Heyer, W.R.; Donnelly, M.A.; McDiarmid, R.W.; Hayek, L.C. y Foster, M.S. (1994) *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, USA. 364 p.
- Heyer, W.R.; McDiarmid, R.W. y Weigmann, D.L. (1975) *Tadpoles, predation and pond habitats in the tropics*. Biotropica. 7: 100 - 111.
- Hill, E.F. (1995) *Organophosphorus and carbamate pesticides*. En: *Handbook of Ecotoxicology* (Eds. Hoffman, D.J.; Rattner, B.A.; Burton, Jr., G.A. y Cairns, J.), CRC Press, Boca Raton, FL, p. 243 - 273.
- Hillebrand, H.; Bennett, D.M. y Cadotte, M.W. (2008) *Consequences of dominance: a review of evenness effects on local and regional ecosystem processes*. Ecology 89(6): 1510 - 1520.
- Hoff, K.S.; Blaustein, A.R.; McDiarmid, R.W. y Altig, R. (1999) *Behavior: interactions and their consequences*. En: *Tadpoles. The biology of anuran larvae* (Eds.: McDiarmid, R.W. y Altig, R.), University of Chicago Press, Chicago y London, p. 215 - 239.
- Hooser, E.A.; Belden, J.B.; Smith, L.M. y McMurry, S.T. (2012) *Acute toxicity of three strobilurin fungicide formulations and their active ingredients to tadpoles*. Ecotoxicology 21(5): 1458 - 1464.

- Hopkins, W.A. (2007) *Amphibians as models for studying environmental change*. ILAR J. 48(3): 270 - 277.
- Horat, P. y Semlitsch, R.D. (1994) *Effects of predation risk and hunger on the behaviour of two species of tadpoles*. Behav. Ecol. Sociobiol. 34: 393 - 401.
- Howe, C.M.; Berrill, M.; Pauli, B.D.; Helbring, C.C.; Werry, K. y Veldhoen, N. (2004) *Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species*. Environ. Toxicol. Chem. 23: 1928 - 1938.
- I**ngermann, R.L.; Bencic, D.C. y Verrell, P. (2002) *Methoxychlor alters the predatory-prey relationship between dragonfly naiads and salamander larvae*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 69: 771 - 777.
- Iriondo, M.H.; Paggi, J.C. y Parma, M.J. (2007) *The Middle Paraná River: Limnology of a Subtropical Wetland*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.
- IUCN, 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <<http://www.iucnredlist.org>>.
- Izaguirre, M.F.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Soler, A.P. y Casco, V.H. (2000) *Cypermethrin-induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae)*. B. Environ. Contam. Tox. 65: 501 - 507.
- J**ager, T.; Heugens, E.H.W. y Kooijman, S.A.L.M. (2006) *Making sense of ecotoxicological test results: towards application of process-based models*. Ecotoxicology 15: 305 - 314.
- Jansen, A. y Healey, M. (2003) *Frog communities and wetland condition: relationships with grazing by domestic livestock along an Australian floodplain river*. Biol. Conserv. 109: 207 - 219.
- Janssens, L. y Stoks, R. (2012) *How does a pesticide pulse increase vulnerability to predation? Combined effects on behavioral antipredator traits and escape swimming*. Aquat. Toxicol. 110-111: 91 - 98.
- Jara, F.G. y Perotti, M.G. (2006) *Variación ontogenética en la palatabilidad de los renacuajos de *Bufo spinulosus Papillosus Philippi, 1902* (Anura, Bufonidae)*. Cuad. Herpetol. 19: 37 - 42.
- Jara, F.G. y Perotti, M.G. (2010) *Risk of predation and behavioural response in three anuran species: influence of tadpole size and predator type*. Hydrobiologia 644(1): 313 - 324.
- Jebali, J.; Banni, M.; Guerbej, H.; Almeida, E.; Bannaoui, A. y Boussetta, H. (2006) *Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli**. Fish Physiol. Biochem. 32: 93 - 98.

- Jergentz, S.; Mugni, H.; Bonetto, C. y Schulz, R. (2005) *Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina*. *Chemosphere* 61: 817 - 826.
- Jifa, W.; Zhiming, Y.; Xiuxian, S.; You, W. y Xihua, C. (2005) *Comparative researches on effects of sodium dodecylbenzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate upon *Lateolabrax japonicus* biomarker system*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20: 465 - 470.
- Jiraungkoorskul, W.; Upatham, E.S.; Kruatrachue, M.; Sahaphong, S.; Vichasri-Grams, S. y Pokethitiyook, P. (2003) *Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)*. *Environ. Toxicol.* 19: 260 - 267.
- Johnson, K.E. y Eidietis, L. (2005) *Tadpole body zones differ in dragonfly naiad strike frequencies and kill rates*. *Copeia* 2005(4): 908 -912.
- Jones, D.K.; Hammond, J.I. y Relyea, R.A. (2009) *Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity*. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1939 - 1945.
- Jones, D.K.; Hammond, J.I. y Relyea, R.A. (2011) *Competitive stress can make the herbicide Roundup® more deadly to larval amphibians*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30(2): 446 - 454.
- Jung, R.E. y Jagoe, C.H. (1995) *Effects of low pH and aluminum on body size, swimming performance, and susceptibility to predation of green tree frog (*Hyla cinerea*) tadpoles*. *Can. J. Zool.* 73: 2171 - 2183.
- Junges, C.M.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Attademo, A.M. y 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): 1233 - 1238.
- Junges, C.M.; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Cabagna-Zenklusen, M.C.; Basso, A. (2012) *Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction*. *Chemosphere* 87: 1348 - 1354.
- Junk, W.J., Bayley, P.B. y Spark, R.E. (1989) *The flood pulse concept in river-floodplain systems*. En: *Proceedings of international large river symposium (LARS)* (Ed.: Dodge, D.P.), Canadian Special Publications on Fisheries and Aquatic Sciences 106: 110 - 127.
- K**ane, A.S.; Salierno, J.D. y Brewer, S.K. (2005) *Fish models in behavioral toxicology: automated techniques, updates and perspectives*. En: *Methods in Aquatic Toxicology* (Ed.: Ostrander, G.K.), p. 559 - 590.

- Kang, J.J. y Fang, H.W. (1997) *Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 238: 367 - 369.
- Kats, L.B. y Ferrer, R.P. (2003) *Alien predators and amphibian declines: Review of two decades of science and the transition to conservation*. *Divers. Distrib.* 9: 99 - 110.
- Kats, L.B.; Petranka, J.W. y Sih, A. (1988) *Antipredator defenses and the persistence of amphibian larvae with fishes*. *Ecology* 69: 1865 - 1870.
- Kavitha, P. y Venkateswara Rao, J. (2007) *Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 87: 182 - 188.
- Kehr, A.I. (1992) *Disposición espacial de las masas de huevos y estados larvales en una población de *Hyla pulchella pulchella* (Anura: Hylidae)*. *Acta Zoologica Lilloana* 41: 135 - 142.
- Kehr, A.I. (1994a) *Density-dependent responses in *Bufo arenarum* tadpoles*. *PHYSIS. B* 49(116-117): 31 - 36.
- Kehr, A.I. (1994b) *Patrones de dispersión espacio-temporales y su influencia en la biología larval de *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura)*. *Neotropica* 40 (103-104): 35- 40.
- Kehr, A.I. y Marangoni, F. (1999) *Variación intrapoblacional en el crecimiento y tamaño en la metamorfosis de *Bufo paracnemis*, bajo condiciones naturales*. *Neotrópica* 45 (113-114): 63 - 68.
- Kehr, A.I. y Schnack, J.A. (1991) *Predator-prey relationship between water bugs (*Belostoma oxyurum*) and larval anurans (*Bufo arenarum*)*. *Alytes* 9 (3): 61 - 69.
- Kehr, A.I. y Williams, J.D. (1990) *Larvas de Anuros de la República Argentina*. *Cuad. Herpetol. (Serie Monografías)* 2: 1 - 44.
- Kehr, A.I.; Schaefer, E.F. y Duré, M.I. (2004) *The tadpole of *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leptodactylidae)*. *J. Herpetol.* 38(1): 145 - 148.
- Kendall, R.J.; Anderson, T.A.; Baker, R.J.; Bens, K.M.; Carr, J.A.; Chiodo, L.A.; Cobb, GP.; Dickerson, R.L.; Dixon, K.R.; Frame, L.T.; Hooper, M.J.; Martin, C.F.; McMurry, S.T.; Patino, R.; Smith, E.E. y Theodorakis, C.W. (2005) *Ecotoxicología*. En: *Fundamentos de Toxicología*. (Eds.: Klaassen, C.D. y Watkins, J.B.) Casarett y Doull, McGraw-Hill /Interamericana, Madrid, España, p. 428 - 437.
- Kingsley, G.R. (1942) *The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual calorimetry*. *J. Lab. Clin. Med.* 27: 840 - 845.

- Kloas, W. (2002). *Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors*. En: *International review of cytology*. Academic Press, p. 1 - 57.
- Kloskowski, J. (2009). *Size-structured effects of common carp on reproduction of pond-breeding amphibians*. *Hydrobiologia* 635: 205 - 213.
- Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O. y Nyholm, N. (1996) *No-effect concentrations in algal growth inhibition tests*. *Water Res.* 30: 1625 - 1632.
- Kopp, K.; Wachlevski, M. y Eterovick, P.C. (2006) *Environmental complexity reduces tadpole predation by water bugs*. *Can. J. Zoolog.* 84: 136 - 140.
- Kovach, W. (2003) *Multivariate Statistical Package*, version 3.01. Kovach Computing Services, Anglesey, Wales (<http://www.kovcomp.co.uk/mvsp/index.html>).
- Kruzynski, G.M.; Birtwell, I.K. y Chew, G.L. (1994) *Behavioural approaches to demonstrate the ecological significance of exposure of juvenile Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) to the antisapstain fungicide TCMTB*. *J. Aquatic Ecosystem Health* 3: 113 - 127.
- Kullander, S.O. (2003) *Family synbranchidae (swamp-eels)*. En: *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America* (Eds.: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J., Jr.). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, p. 594 - 595.
- L**agadic, L.; Caquet, T. y Ramade, F. (1994) *The role of biomarkers in environmental assessment Invertebrate populations and communities*. *Ecotoxicology* 3: 193 - 208.
- Lagadic, L.; Caquet, T.; Amiard, J.C. y Ramade, F. (1997) *Biomarqueurs en écotoxicologie principes et définitions*. En: *Biomarqueurs en écotoxicologie aspects fondamentaux*. Masson, Paris, p. 1 - 10.
- Lajmanovich, R.C. (1994) *Contribución al conocimiento de la alimentación de larvas de la rana criolla *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia: Anura) en el Paraná, Argentina*. *Stud. Neotrop. Fauna E.* 29(1): 55 - 61.
- Lajmanovich, R.C. (1997) *Alimentación de larvas de anuros en ambientes temporales del sistema del Río Paraná, Argentina*. *Doñana Acta Vertebrata* 24: 191 - 202.
- Lajmanovich, R.C. (2000) *Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros*. *Interciencia* 25(2): 71 - 79.
- Lajmanovich R.; Attademo A.; Peltzer P.; Junges C. y Cabagna M. (2011) *Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione s-transferase inhibitions*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60(4): 681 - 689.

- Lajmanovich R.; De La Sierra, P.; Marino, F.; Peltzer, P.; Lenardón, A. y Lorenzatti, E. (2005b) *Determinación de residuos de organoclorados en vertebrados silvestres del litoral fluvial de Argentina*. En: *Temas de la Biodiversidad del Litoral Fluvial Argentino II* (Ed.: Aceñolaza, F.G.), INSUGEO, Miscelánea 14, Tucumán, Argentina, p 255 - 262.
- Lajmanovich, R.C. y Peltzer, P.M. (2001) *Evaluación de la diversidad de anfibios de un remanete forestal del valle aluvial del río Paraná (Entre Ríos-Argentina)*. Boletín de la Asociación Herpetológica Española 12(1): 12 - 17.
- Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Junges, C.M. (2009) *Inhibition and recovery of brain and tail cholinesterases of *Odontophrynus americanus* tadpoles (Amphibia: Cycloramphidae) exposed to fenitrothion*. J. Environ. Biol. 30 (5): 923 - 926.
- Lajmanovich, R.C.; Cabagna, M.; Peltzer, P.M.; Stringhini, G.A. y Attademo, A.M. (2005a) *Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan*. Mutat. Res. 587: 67 - 72.
- Lajmanovich, R.C.; Lorenzatti, E.; de la Sierra, P.; Marino, F. y Peltzer, P.M. (2002) *First registrations of organochlorines pesticides residues in amphibians of the Mesopotamic Region, Argentina*. Froglog 54: 4.
- Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Junges, C.M.; Attademo, A.M.; Sanchez, L.C. y Bassó, A. (2010) *Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River floodplain: Implication for ecological risk assessment of soybean crops*. Ecotox. Environ. Saf. 73: 1517 - 1524.
- Lajmanovich, R.C.; Sánchez-Hernández, J.C.; Stringhini, G. y Peltzer, P.M. (2004) *Levels of serum cholinesterase activity in the rococo toad (*Bufo paracnemis*) in agrosystems of Argentina*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72: 548 - 591.
- Lajmanovich, R.C.; Sandoval, M.T. y P.M. Peltzer (2003) *Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed by Glyphosate formulations*. B. Environ. Contam. Tox. 70: 612 - 618.
- Lanteri, L. (2009) *Respuesta a precios del área sembrada de soja en la Argentina*. Documentos de Trabajo 2009, Banco Central de la República Argentina, Investigaciones Económicas, p. 1 - 39.
- Lavilla, E.O. y Cej, J.M. (2001) *Amphibians of Argentina. A second update, 1987-2000*. Monografía XXVIII. Mus. Nac. Sci. Nat., Torino, 177 p.
- Lavilla, E.O.; Langone, J.A.; Caramaschi, U.; Heyer, W.R. y De Sá, R.O. (2010) *The identification of *Rana ocellata* Linnaeus, 1758. Nomenclatural impact on the species*



- currently known as *Leptodactylus ocellatus* (Leptodactylidae) and *Osteopilus brunneus* (Gosse, 1851) (Hylidae). *Zootaxa* (2346): 1 - 16.
- Lawler, K.L. y Hero, J.M. (1997) *Palatability of Bufo marinus tadpoles to a predatory fish decreases with development*. *Wildlife Res.* 24(3): 327 - 334.
- Leite, P.Z.; Margarido, T.C.S.; de Lima, D.; Rossa-Feres, D.D.C. y de Almeida, E.A. (2010) *Esterase inhibition in tadpoles of Scinax fuscovarius (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides*. *Environ. Sci. Pollut. R.* 17(8): 1411 - 1421.
- Li, B.; Stribley, J.A.; Ticu, A.; Xie, W.; Schopfer, L.M.; Hammond, P.; Brimijoin, S.; Hinrichs, S.H. y Lockridge, O. (2000) *Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse*. *J. Neurochem.* 75: 1320 - 1331.
- Liem, K. (1968) *Geographical and taxonomic variation in the pattern of natural sex reversal in the teleost order Synbranchiformes*. *J. Zool.* 156: 225 - 238.
- Lips, K.R.; Burrowes, P.A.; Mendelson, J.R. y Parra-Olea, G. (2005) *Amphibian Population Declines in Latin America: A Synthesis*. *Biotropica* 37(2): 222 - 226.
- Little, E.E. (2002) *Behavioural measures of injuries to fish and aquatic organisms: regulatory considerations*. En: *Behavioural Ecotoxicology* (Ed.: Dell'Omo, G.) 463: 411 - 432.
- Little, E.E.; Archeski, R.D.; Flerov, B.A. y Kozlovskaya, V.I. (1990) *Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 380 - 385.
- Lo Nostro, F. y Guerrero, G. (1996) *Presence of primary and secondary males in a population of Synbranchus marmoratus, Bloch 1795, a protogynous fish (Teleoste-Synbranchiformes)*. *J. Fish Biol.* 49: 788 - 800.
- Lockridge, O.; Bartels, C.F.; Vaughan, T.A.; Wong, C.K.; Norton, S.E. y Johnson, L.L. (1987) *Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase*. *J. Biol. Chem.* 262: 549 - 557.
- López, H.L.; Miquelarena, A.M. y Menni, R.C. (2003) *Lista comentada de los peces continentales de la Argentina*. Probiota. Serie Técnica y Didáctica N° 5, La Plata, Buenos Aires, 87 p.
- Lorenzatti, E.; Maitre, M.; Lenardón, A.; Lajmanovich, R.; Peltzer P. y Anglada, M. (2004) *Pesticide residues in immature soybean in Argentina croplands*. *Fresen. Environ. Bull.* 13: 675 - 678.
- Lowe-McConnell, R.H. (1975) *Fish Communities in Tropical Freshwaters*. Longman Inc., New York.

- Lower, W.R. y Kendall, R.J. (1990) *Sentinel species and sentinel bioassay*. En: *Biomarkers of Environmental Contamination* (Eds.: Mc Carthy, J.F. y Shugart, L.R.) Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA, p 309 - 331.
- Lüling, K.H. (1980) *Biotop, begleitfauna und amphibische lebensweise von Synbranchus marmoratus (Pisces Synbranchidae) in seitengewässern des mittleren Paraná*. Bonner Zool Beitr.1 - 2(31): 111 - 143.
- M**affei, F.; Ubaid, F.K. y Jim, J. (2011) *Anurans in an open cerrado area in the municipality of Borebi, São Paulo state, Southeastern Brazil: habitat use, abundance and seasonal variation*. Biota Neotrop. 11: 221 - 233.
- Maggese, M.A.; Ravaglia, M. y Guerrero, G. (1993) *Cultivo de Synbranchus marmoratus, un desafío productivo para América Latina*. En: *From discovery to commercialization* (Eds.: Carrill, M.; Dahle, L.; Morales, J.; Sogeloos, P.; Svennevig, N. y Wyban, J.). Spec. Publ. Eur. Aquacult. Soc. (19), European Aquaculture Society, Oostende, Belgium, p: 238.
- Mandrillon, A. y Saglio, P. (2007) *Waterborne amitrole affects the predator-prey relationship between common frog tadpoles (Rana temporaria) and larval spotted salamander (Salamandra salamandra)*. Environ. Toxicol. 53: 233 - 240.
- Mann, R.M. y Bidwell, J.R. (1999) *The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern australian frogs*. Arch. Environ. Con. Tox. 36: 193 - 199.
- Mann, R.M. y Bidwell, J.R. (2001) *The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs*. Environ. Pollut. 114: 195 - 205.
- Mann, R.M.; Bidwell, J.R. y Tyler, M.J. (2003) *Toxicity of herbicide formulations to frogs and the implications for product registration: a case study from Western Australia*. Appl. Herpetol. 1: 13 - 22.
- Mann, R.M.; Hyne, R.V.; Choung, C.B. y Wilson, S.P. (2009) *Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment*. Environ. Pollut. 157(11): 2903 - 2927.
- Martin, J.R. (2004) *A portrait of locomotor behaviour in Drosophila determined by a video-tracking paradigm*. Behav. Process 67: 207 - 219.
- Martínez-Haro, M.; Viñuela, J. y R. Mateo (2007) *Exposure of birds to cholinesteraseinhibiting pesticides following a forest application for tick control*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 23: 347 - 349.

- Martins, C.I.M.; Galhardo, L.; Noble, C.; Damsgård, B.; Spedicato, M.T.; Zupa, W.; Beauchaud, M.; Kulczykowska, E.; Massabuau, J.C.; Carter, T.; Planellas, S.R. y Kristiansen, T. (2012) *Behavioural indicators of welfare in farmed fish*. *Fish Physiol Biochem.* 38(1): 17 - 41.
- Matson, C.W.; Lambert, M.M.; McDonald, T.J.; Autenrieth, R.L.; Donnelly, K.C.; Islamzadeh, A.; Politov, D.I. y Bickham, J.W. (2006) *Evolutionary toxicology: population-level effects of chronic contaminant exposure on the marsh frogs (Rana ridibunda) of Azerbaijan*. *Environ. Health Perspect.* 114(4): 547 - 552.
- McCarthy, J. y Shugart, L. (1990) *Biological markers of environmental contamination*. En: *Biomarkers of environmental contamination* (Eds.: McCarthyand, J. y Shugart L.). Lewis Publishers, Boca Raton, London, p. 3 - 14.
- McCoy, K.A.; Bortnick, L.J.; Campbell, C.M.; Hamlin, H.J.; Guillette Jr., L.J. y St Mary, C.M. (2008) *Agriculture alters gonadal form and function in the toad Bufo marinus*. *Environ. Health Perspect.* 116: 1526 - 1532.
- McDiarmid, R.W. y Altig, R. (1999) *Tadpoles. The Biology of Anuran Larvae*. The University of Chicago Press, Chicago.
- McIntyre, P.B. y McCollum, S.A. (2000) *Responses of bullfrog tadpoles to hypoxia and predators*. *Oecologia* 125: 301 - 308.
- Mehrani, H. (2004) *Protective effect of polyurethane immobilized human butyrylcholinesterase against parathion inhalation in rat*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 16: 179 - 185.
- Menéndez-Helman, R.J.; Ferreyroa, G.V.; dos Santos, A.M. y Salibián, A. (2012) *Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88(1): 6 - 9.
- Mills, N.E. y Semlitsch, R.D. (2004) *Competition and predation mediate the indirect effects of an insecticide on southern leopard frogs*. *Ecol. Appl.* 14: 1041 - 1054.
- Modesto, K.A. y Martinez, C.B. (2010) *Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78: 294 - 299.
- Mohammad, H.B. y Garza Almanza, V. (2007) *Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos*. *CULCYT* 4(18): 9 - 25.
- Monroy, C.M.; Cortés, A.C.; Sicard, D.M. y Groot de Restrepo, H. (2005) *Citotoxicidad y genotoxicidad en células humana expuestas in vitro a glifosato*. *Biomédica* 25: 335 - 345.
- Monserrat, J.M.; Martínez, P.E.; Geracitano, L.A.; Amado, L.L.; Martins, C.M.G.; Pinho, G.L.L.; Chavez, I.S.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-Lima, J y Bianchini, A (2007) *Pollution*

- biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives*. Comp. Biochem. Physiol. C 146: 221 - 234.
- Moore, D.R.J. y Caux, P.Y. (1997) *Estimating low toxic effects*. Environ. Toxicol. Chem. 16: 794 - 801.
- Morello, J. y Mateucci, S.D. (1999) *Biodiversidad y fragmentación de los bosques en Argentina*. En: *Biodiversidad y Uso de la Tierra: Conceptos y Ejemplos de América Latina* (Eds.: Mateucci, S.D.; Solbrig, O.T.; Morello, J. y Halfpeter, G.), EUDEBA, Col. CEA 24, p. 463 - 498.
- Morello, J. y Rodríguez, A.F. (2007) *Ambiente y ecología en un país joven agroexportador; Argentina*. Fronteras GEPAMA-FADU-UBA 6: 1 - 12.
- Neiff, J.J. (1999) *El régimen de pulsos en ríos y grandes humedales de Sudamérica*. En: *Tópicos sobre grandes humedales sudamericanos* (Eds.: Malvárez, A.I. y Kandus, P.), ORCYT-MAB (UNESCO), Montevideo, Uruguay, p. 97 - 146.
- Neiff, J.J. y Giraudo, A.R. (2006) *Inundaciones y sequías: los grandes reguladores del paisaje del río Paraná*. En: *Sitio Ramsar Jaaukanigás: Biodiversidad, Aspectos Socioculturales y Conservación (Río Paraná, Santa Fe, Argentina)*. (Ed.: Giraudo, A.R.), Colección Climax N°14, Asociación de Ciencias Naturales del Litoral, Comité Intersectorial de Manejo del Sitio Ramsar Jaaukanigás, Humedales para el Futuro, Ramsar, Santa Fe, p. 69 - 75.
- Newman, M.C. y Unger, M.A. (2003) *Fundamentals of ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Newton, M.; Horner, L.H.; Cowell, J.E.; White, D.E. y Cole, E.C. (1994) *Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forests*. J. Agr. Food Chem. 42: 1795 - 1802.
- NGNCA: Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente (2003) *Glifosato*. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, Argentina, 24 p.
- NGNCA: Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente (2004a) *Endosulfán*. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, Argentina, 18 p.
- NGNCA: Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente (2004b) *Fenitrotion*. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, Argentina, 11 p.
- Nicieza, A.G. (1999) *Context-dependent aggregation in Common Frog Rana temporaria tadpoles: influence of developmental stage, predation risk and social environment*. Funct. Ecol. 13: 852 - 858.

- Nickum, J.G.; Bart, H.L. Jr.; Bowser, P.R.; Greer, I.E.; Hubbs, C.; Jenkins, J.A.; MacMillan, J.R.; Rachlin, J.W.; Rose, J.D.; Sorensen, P.W. y Tomasso, J.R. (2004) *Guidelines for the Use of Fishes in Research*. Bethesda MD: American Fisheries Society. [http://www.fisheries.org/html/Public\\_Affairs/Sound\\_Science/Guidelines2004.html](http://www.fisheries.org/html/Public_Affairs/Sound_Science/Guidelines2004.html)
- Noland, R. y Ultsch, G.R. (1981) *The roles of temperature and dissolved oxygen in microhabitat selection by the tadpoles of a frog (Rana pipiens) and a toad (Bufo terrestris)*. Copeia 1981: 645 - 652.
- Nomura, F.; do Prado, V.H.M.; da Silva, F.R.; Borges, R.E.; Dias, N.Y.N. y Rossa-Feres, D. de C. (2011) *Are you experienced? Predator type and predator experience trade - offs in relation to tadpole mortality rates*. J. Zool. 284(2): 144 - 150.
- Nunes, B.; Carvalho, F. y Guilhermino, L. (2006) *Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean Artemia parthenogenetica*. Chemosphere 62: 581 - 594.
- Nunes, B.; Carvalho, F.; Guilhermino, L. (2005) *Characterization and use of the total head soluble cholinesterases from the mosquitofish (Gambusia holbrooki) for screening of anticholinesterase activity*. J. Enzym. Inhib. Med.Ch. 20: 369 - 376.
- O**esterheld, M. (2008) *Impacto de la agricultura sobre los ecosistemas. Fundamentos ecológicos y problemas más relevantes*. Ecología Austral 18: 337 - 346.
- Oldani N.O. y Oliveros, O. (1984) *Estudios limnológico en una sección transversal del tramo medio del río Paraná. XII: Dinámica temporal de peces de importancia económica*. Revista de la Asociacion Ciencias Naturales del Litoral 15(2): 176 - 183.
- Oldani, N. (1990) *Variaciones de la abundancia de peces del valle del río Paraná*. Rev. Hydrobiol. Trop. 23(1): 67 - 76.
- Oliveira, C.; Almeida, J.R.; Guilhermino, L.; Soares, A.M. y Gravato, C. (2012) *Swimming velocity, avoidance behavior and biomarkers in Palaemon serratus exposed to fenitrothion*. Chemosphere 90(3): 936 - 944.
- Oropesa, A.L.; Perez-Lopez, M.; Hernandez, D.; Garcia, J.P.; Fidalgo, L.E.; Lopez- Beceiro, A. y Soler, F. (2007) *Acetylcholinesterase activity in seabirds affected by the Prestige oil spill on the Galician coast (NW Spain)*. Sci. Total Environ. 372: 532 - 538.
- Ortiz, J.B.; González de Canales, M.L. y Sarasquete, C. (2003) *Histopathological changes induced by lindane ( $\gamma$ -HCH) in various organs of fishes*. Sci. Mar. 67: 53 - 61.

- Paganelli, A.; Gnazzo, V.; Acosta, H.; López, S.L. y Carrasco, A.E. (2010) *Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling*. Chem. Res. Toxicol. 23: 1586 - 1595.
- Page, D.S.; Chapman, P.M.; Landrum, P.F.; Neff, J. y Elston, R. (2012) *a perspective on the toxicity of low concentrations of petroleum-derived polycyclic aromatic hydrocarbons to early life stages of herring and salmon*. Hum. Ecol. Risk Assess. 18(2): 229 - 260.
- Parmelee, J.R. (1999) *Trophic ecology of a tropical anuran assemblage*. Scientific Papers Natural History Museum University of Kansas 11: 1 - 59.
- Paruelo, J.M.; Guerschman, J.P.; Piñeiro, G.; Jobbágy, E.G.; Verón, S.R.; Baldi, G. y Baeza, S. (2006) *Cambios en el uso de la tierra en Argentina y Uruguay: marcos conceptuales para su análisis*. Agrociencias X: 47 - 61.
- Peacor, S.D. y Werner, E.E. (2001) *The contribution of trait - mediated indirect effects to the net effects of a predator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(7): 3904 - 3908.
- Peltzer, P.M y Lajmanovich, R.C. (2007) *Amphibians*. En: *The Middle Paraná River: Limnology of a Subtropical Wetland* (Eds.: Iriondo, M.H.; Paggi, J.C. y Parma, M.J.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 328 - 340.
- Peltzer, P.M. y Lajmanovich, R.C. (2001) *Habitat fragmentation and amphibian species richness in riparian areas of the Parana River, Argentina*. Froglog 46: 5.
- Peltzer, P.M. y Lajmanovich, R.C. (2004) *Anuran tadpole assemblages in riparian areas of the Middle Paraná River, Argentina*. Biodivers. Conserv. 13: 1833 - 1842.
- Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C. y Beltzer, A.H. (2003) *The effects of habitat fragmentation on amphibian species richness in the floodplain of the Middle Parana River, Argentina*. Herpetol. J. 13: 95 - 98.
- Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M. y Beltzer, A.H. (2006) *Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina*. Biodivers. Conserv. 15: 3499 - 3513.
- Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; y Cejas, W. (2005) *Diversidad y conservación de anuros en ecosistemas agrícolas de Argentina: implicancias en el control biológico de plagas*. Insugeo 14: 399 - 416.
- Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Sanchez, L.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Bionda, C.L.; Martino, A.L. y Bassó, A. (2011) *Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid - eastern region of Argentina*. Herpetol. Conserv. Biol. 6(3): 432 - 442.
- Peltzer, P.M.; Ponssa, M.L. y Lajmanovich, R.C. (2001) *Caso de malformación en Leptodactylus mystacinus (Anura, Leptodactylidae)*. Nat. Neotrop. 32(2): 165 - 168.

- Peltzer, P.M; Lajmanovich, R.C.; Sánchez-Hernández, J.C.; Cabagna, M.; Attademo, A.M; Bassó, A. (2008) *Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of Scinax nasicus tadpoles*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70(1): 185 - 197.
- Perkins, P.J.; Boermans, H.J. y Stephenson, G.R. (2000) *Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay: Xenopus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 940 - 945.
- Perotti, M.G. y Céspedes, J.A. (1999) *The tadpole of Physalaemus santafecinus, with comments on buccopharyngeal morphology*. *J. Herpetol.* 33(2): 312 - 315.
- Perry, G. y Pianka, E.R. (1997) *Animal foraging: past, present and future*. *TREE* 12(9): 360 - 363.
- Peruzzo, P.J.; Porta, A.A. y Ronco, A.E. (2008) *Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina*. *Environ. Pollut.* 156: 61 - 66.
- Pestana, J.L.T.; Loureiro, S.; Baird, D.J. y Soares, A.M.V.M. (2009) *Fear and loathing in the benthos: Responses of aquatic insect larvae to the pesticide imidacloprid in the presence of chemical signals of predation risk*. *Aquat. Toxicol.* 93: 138 - 149.
- Petranka, J.W. (1983) *Fish predation: a factor affecting the spatial distribution of a stream-breeding salamander*. *Copeia* 1983: 624 - 628.
- Petry, P.; Bayley, P.B. y Markle, D.F. (2003) *Relationships between fish assemblages, macrophytes and environmental gradients in the amazon river floodplain*. *J. Fish Biol.* 63: 547 - 579.
- Plaut, I. (2001) *Critical swimming speed: its ecological relevance*. *Comp Biochem Physiol A* 131: 41 - 50.
- Postma, J.F.; Buckert-de Jogn, M.C.; Staats, N. y Davids, C. (1994) *Chronic toxicity of cadmium to Chironomus riparius (Diptera: Chironomidae) at different food levels*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 143 - 148.
- Preisser, E.L.; Bolnick, D.I. y Benard, M.F. (2005) *Scared to death? The effects of intimidation and consumption in predator-prey interactions*. *Ecology* 86(2): 501 - 509.
- Punzo, F. (2005) *Effects of insecticide (carbaryl) exposure on activity and swimming performance of tadpoles of the Rio Grande leopard frog, Rana berlandieri (Anura: Ranidae)*. *Tex. J. Sci.* 57: 263 - 272.
- Pyron, R.A. y Wiens, J.J. (2011) *A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2,800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 61: 543 - 583.

- R**acke, K.D. (1992) *Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices*.  
 En: *Organophosphates: Chemistry, Fate, and Effects* (Eds.: Chambers, J.E. y Levi, E.P.),  
 Academic Press, Inc. California, p. 47 - 77.
- Raimondo, S.M.; Rowe, C.L. y Congdon, J.D. (1998) *Exposure to coal ash impacts swimming performance and predator avoidance in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*)*. *J. Herpetol.* 32: 289 - 292.
- Rand, G.M. y Petrocelli, S.R. (1985) *Fundamentals of aquatic toxicology*. Taylor and Francis. Bristol, USA.
- Rault, M.; Collange, B.; Mazzia, C. y Capowiez, Y. (2008) *Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion*. *Soil Biol. Biochem.* 40: 3086 - 3091.
- Raveh, L.; Grauer, E.; Grunwald, J.; Cohen, E. y Ashani, Y. (1997) *The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with butyrylcholinesterase*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145: 45 - 53.
- Real, R.; Vargas, J.M. y Antúnez, A. (1993) *Environmental influences on local amphibian diversity: the role of floods on river basins*. *Biod. Conserv.* 2: 376 - 399.
- Reeves, M.K.; Jensen, P.; Dolph, C.L.; Holyoak, M. y Trust, K.A. (2010) *Multiple stressors and the cause of amphibian abnormalities*. *Ecol. Monogr.* 80: 423 - 440.
- Relyea R.A. (2001b) *Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators*. *Ecology* 82: 523 - 540.
- Relyea, R. A. (2001a) *The relationship between predation risk and anti-predator responses in larval anurans*. *Ecology* 82:541 - 554.
- Relyea, R.A. (2002) *Local population differences in phenotypic plasticity: predator-induced changes in wood frog tadpoles*. *Ecol. Monogr.* 72: 77 - 93.
- Relyea, R.A. (2003a) *Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians*. *Ecol. Appl.* 13: 1515 - 1521.
- Relyea, R.A. (2003b) *How prey respond to combined predators: a review and an empirical test*. *Ecology* 84: 1827 - 1839.
- Relyea, R.A. (2004) *Synergistic impacts of malathion and predatory stress on six species of North American tadpoles*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 1080 - 1084.
- Relyea, R.A. (2005) *The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles*. *Arch. Environ. Con. Tox.* 48: 351 - 357.



- Relyea, R.A. (2007) *Getting out alive: how predators affect the decision to metamorphose*. *Oecologia* 152: 389 - 400.
- Relyea, R.A. (2009) *A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities*. *Oecologia* 159: 363 - 376.
- Relyea, R.A. (2012) *New effects of Roundup on amphibians: predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology*. *Ecol. Appl.* 22(2): 634 - 647.
- Relyea, R.A. y Diecks, N. (2008) *An unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations*. *Ecol. Appl.* 18(7): 1728 - 1742.
- Relyea, R.A. y Edwards, K. (2010) *What doesn't kill you makes you sluggish: how sublethal pesticides alter predator-prey interactions*. *Copeia* 4: 558 - 567.
- Relyea, R.A. y Hoverman, J.T. (2008) *Interactive effects of pesticides and predators on aquatic communities*. *Oikos* 117:1647 - 1658.
- Relyea, R.A. y Jones, D.K. (2009) *The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians*. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 2004 - 2008.
- Relyea, R.A. y Mills, N. (2001) *Predator-induced stress makes pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*)*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2491 - 2496.
- Relyea, R.A.; Schoeppner, N.M., y Hoverman, J.T. (2005) *Pesticides and amphibians: the importance of community context*. *Ecol. Appl.* 15(4): 1125 - 1134.
- Repetto, M. (1995) *Toxicología avanzada*. Madrid, España.
- Reuveni, M. (2000) *Efficacy of trifloxystrobin (Flint), a new strobilurin fungicide, in controlling powdery mildews on apple, mango and nectarine, and rust on prune trees*. *Crop Prot.* 19(5): 335 - 341.
- Richardson, J.M.L. (2001) *A comparative study of activity levels in larval anurans and response to the presence of different predators*. *Behav. Ecol.* 12(1): 51 - 58.
- Rinderhagen, M.; Ritterhoff, J.; Zauke, G.P. (2000) *Biomonitoring of polluted water-reviews on actual topics*. En: *Environmental research forum*. Trans. Tech. Publications, Uetikon-Zuerich, p. 161 - 194.
- Ringuelet, R.A. (1961) *Rasgos fundamentales de la Zoogeografía de la Argentina*. *Physis* 22(63): 151 - 170.
- Ringuelet, R.A.; Aramburu, R.H. y de Arámburu, A.A. (1967) *Los peces argentinos de agua dulce*. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Buenos Aires.
- Rist, L. (1994) *Feeding time, food consumption, and growth efficiency of *Rana lessonae* and *Rana esculenta* tadpoles*. M.Sc. Thesis, University of Zurich, Zurich.

- Rodriguez, M.S. (1999) *El espectro trófico de juveniles de *Symbranchus marmoratus* (Synbranchiformes: Synbranchidae)*. Iheringia Sér. Zool. 86: 137 - 143.
- Rohr, J.R. y Crumrine, P.W. (2005) *Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes*. Ecol. Appl. 15: 1135 - 1147.
- Rohr, J.R.; Elskus, A.A.; Shepherd, B.S.; Crowley, P.H.; McCarthy, T.M.; Niedzwiecki, J.H.; Sager, T.; Sih, A. y Palmer, B.D. (2004) *Multiple stressors and salamanders: effects of an herbicide, food limitation, and hydroperiod*. Ecol. Appl. 14: 1028 - 1040.
- Rohr, J.R.; Schotthoefer, A.M.; Raffel, T.R.; Carrick, H.J.; Halstead, N.; Hoverman, J.T.; Johnson, C.M.; Johnson, L.B.; Lieske, C.; Piwoni, M.D.; Schoff, P.K. y Beasley, V.R. (2008) *Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species*. Nature 455: 1235 - 1239.
- Romani, R.; Isani, G.; DeSantis, A.; Giovannini, E. y Rosi, G. (2005) *Effects of chlorpyrifos on the catalytic efficiency and expression level of acetylcholinesterases in the bivalve mollusk *Scapharca inaequivalvis**. Environ. Toxicol. Chem 24: 2879 - 2886.
- Rosa, L.L. (1977) *Respiração de *Symbranchus marmoratus*. Pisces-Teleostei na água e no ar*. Bol. Fisiol. Animal, Univ. S. Paulo. 1: 39 - 70.
- Rosen, D.E. y Greenwood, P.H. (1976) *A fourth Neotropical species of synbranchid eel and the phylogeny and systematics of synbranchiform fishes*. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 157(1): 1 - 67.
- Rossa-Feres, D.D. y Nomura, F. (2006) *Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil*. Biota Neotropica 6(1): 1 - 26.
- Rossi, L. y Parma, M.J. (1992) *Influencia de la vegetación acuática en la distribución de peces del río Paraná, Argentina*. Ambiente Subtropical 2: 65 - 75.
- Ruamthum, W.; Visetson, S.; Milne, J.R. y Bullangpoti, V. (2011) *Effect of glyphosate-based herbicide on acetylcholinesterase activity in tadpoles, *Hoplobatrachus rugulosus**. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 76(4): 923 - 930.
- Russell, R.W. y Overstreet, D.H. (1987) *Mechanisms underlying sensitivity to organophosphorus anticholinesterase compounds*. Prog. Neurobiol. 28: 97 - 129.
- Saidapur, S.K. (2001) *Behavioral ecology of anuran tadpoles: the Indian scenario*. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. B 67: 311 - 322.
- Sakai, M. (2002) *Use of chronic tests with *Daphnia magna* for examination of diluted river water*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 53: 376 - 381.

- Salibián, A. (1992) *Effects of deltamethrin on the south american toad (Bufo arenarum)*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48(4): 616 - 621.
- Sanchez, L.C. (2011) *Alteraciones de la dinámica y biología reproductiva de anuros (Amphibia, Anura) producidos por el avance de la frontera agrícola en ambientes naturales del delta superior del río Paraná*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, 175 p.
- Sanchez, L.C.; Peltzer, P.M. y Lajmanovich, R.C. (2009) *Structure of wetland-breeding anuran assemblages from the southern section of the Paraná river, Argentina*. Herpetol. J. 19: 173 - 184.
- Sánchez-Botero, J.I. y Araújo-Lima, A.R.M. (2001) *As macrófitas aquáticas como berçário para a ictiofauna da várzea do rio Amazonas*. Acta Amazônica 31: 437 - 447.
- Sánchez-Chávez, G. y Salceda, R. (2008) *Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa*. Revista de Educación Bioquímica 27(2): 44 - 51.
- Sánchez-Hernández, J.C. (2003) *Evaluating reptile exposure to cholinesterase-inhibiting agrochemicals by serum butyrylcholinesterase activity*. Environ. Toxicol. Chem. 22: 296 - 301.
- Sanchez-Hernandez, J.C. (2006) *Earthworm biomarkers in ecological risk assessment*. Rev. Environ. Contam.T. 188: 85 - 126.
- Sánchez-Hernández, J.C. (2007) *Ecotoxicological perspectives of B-esterases in the assessment of pesticide contamination*. En: *Environmental Pollution: New Research*. (Ed.: Plattenberg, R.H.) Nova Science Publishers, New York, USA. p. 1 - 45.
- Sánchez-Hernández, J.C. (2011) *Pesticide Biomarkers in terrestrial invertebrates*. En: *Pesticides in the Modern World-Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity, Assessment* (Ed.: Stoytcheva, M.), InTechOpen, p. 213 - 240.
- Sánchez-Hernández, J.C. y Moreno Sánchez, B. (2002) *Lizard cholinesterase as biomarkers of pesticide exposure: enzymological characterization*. Environ. Toxicol. Chem. 21: 2319 - 2325.
- Sánchez-Hernández, J.C.; Borghini, F.; Corral, A. y Grimalt, J.O. (2004a) *Field uptake rates of hydrophobic organic contaminants by semipermeable membrane devices: environmental monitoring considerations*. J. Environ. Monitor. 6(11): 919 - 925.
- Sánchez-Hernández, J.C.; Carbonell, R.; Henríquez Pérez, A.; Montealegre, M. y Gómez, L. (2004b) *Inhibition of plasma butyrylcholinesterase activity in the lizard Gallotia galloti palmae by pesticides: a field study*. Environ. Pollut. 132: 479 - 488.

- Sánchez-Hernández, J.C.; Fossi, M.C. y Focardi, S. (1997) *Serum "B" esterases as a nondestructive biomarker for monitoring the exposure of reptiles to organophosphorus insecticides*. *Ecotox. Environ. Saf.* 38(1): 45 - 52.
- Sancho, E.; Ferrando, M.D.; Ten, A.; Lleo, C. y Andreu-Moliner, E. (1998) *Sublethal bioconcentration of fenitrothion in the blood and brain of the European eel*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 809 - 815.
- Sandoval, M.T. (2002) *Descripción del disco oral y cavidad bucofaringea de larvas de dos especies de anuros de la familia Leptodactylidae*. Reunión de comunicaciones científicas de La UNNE, Corrientes, 3 p.
- Sárria, M.P.; Soares, J.; Vieira, M.N.; Filipe, L.; Castro, C.; Santos, M.M. y Monteiro, N.M. (2011) *Rapid-behaviour responses as a reliable indicator of estrogenic chemical toxicity in zebrafish juveniles*. *Chemosphere* 85 (10): 1543 - 1547.
- Satorre, E. (2005) *Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual*. *Ciencia Hoy* 15: 24 - 31.
- Sawasdee, B. y Köhler, H.R. (2009) *Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, Marisa cornuarietis (Prosobranchia)*. *Chemosphere* 75(11): 1539 - 1547.
- Saxena, A. Sun, W.; Luo, C.; Myers, T.M.; Koplovitz, I. Lenz, D.E. y Doctor, B.P. (2006) *Bioscavenger for protection from toxicity of organophosphorus compounds*. *J. Mol. Neurosci.* 30: 145 - 148.
- Scarabotti, P.A.; López, J.A. y Pouilly, M. (2011) *Flood pulse and the dynamics of fish assemblage structure from neotropical floodplain lakes*. *Ecol. Freshw. Fish* 20: 605 - 618.
- Schaefer, E.F. (2007) *Restricciones cuantitativas asociadas con los modos reproductivos de los anfibios en áreas de impacto por la actividad arrocera en la provincia de Corrientes*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, 233 p.
- Schmajuk, N.A. y Segura, E.T. (1982) *Behavioral regulation of water balance in the toad Bufo arenarum*. *Herpetologica* 38: 296 - 301.
- Schmidt, B.R. y Amezcuita, A. (2001) *Predator-induced behavioural responses: tadpole of the neotropical frog Phyllomedusa tarsius do not respond to all predators*. *Herpetol. J.* 11: 9 - 15.
- Schrag, A.M.; Zaccagnini, M.E.; Calamari, N. y Canavelli, S. (2009) *Climate and land-use influences on avifauna in central Argentina: broad - scale patterns and implications of agricultural conversion for biodiversity*. *Agric. Ecosyst. Environ.* 132: 135 - 142.

- Schriks, M.; Van Hoorn, M.K.; Faassen, E.J.; Van Dam, J.W. y Murk, A.J. (2006) *Real-time automated measurement of Xenopus leavis tadpole behavior and behavioral responses following triphenyltin exposure using the Multispecies Freshwater Biomonitor (MFB)*. *Aquat. Toxicol.* 77: 298 - 305.
- Scott, G.R. y Sloman, K.A. (2004) *The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity*. *Aquat. Toxicol.* 68: 369 - 392.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (MAGyP). Estimaciones agrícolas: mapa de principales cultivos. Disponible en: [http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/agricultura/cultivos\\_en\\_la\\_argentina](http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/agricultura/cultivos_en_la_argentina).
- Semlitsch, R.D. (1993) *Effects of different predators on the survival and development of tadpoles from the hybridogenetic Rana esculenta complex*. *Oikos* 67: 40 - 46.
- Semlitsch, R.D. y Gibbons, W. (1988) *Fish predation in size-structured populations of treefrog tadpoles*. *Oecologia* 75: 321 - 326.
- Semlitsch, R.D.; Foglia, M.; Mueller, A.; Steiner, I.; Fioramonti, E. y Fent, K. (1995a) *Short-term exposure to triphenyltin affects the swimming and feeding-behavior of tadpoles*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 1419 - 1423.
- Semlitsch, R.D.; Gibbons, J.W. y Tuberville, T.D. (1995b) *Timing of reproduction and metamorphosis in the crawfish frog (Rana areolata) in South Carolina*. *J. Herpetol.* 29: 612 - 614.
- Semlitsch, R.D.; Scott, D.E. y Pechmann, J.H.K. (1988) *Time and size at metamorphosis related to adult fitness in Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 69: 184 - 192.
- Shao, Q. (2000) *Estimation for hazardous concentrations based on NOEC toxicity data: an alternative approach*. *Environmetrics* 11: 583 - 595.
- Shutler, D. y Marcogliese, D.J. (2011) *Leukocyte profiles of northern leopard frogs, Lithobates pipiens, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands*. *Copeia* 301 - 307.
- Sili, M. (2010) *¿Cómo revertir la crisis y la fragmentación de los territorios rurales? Ideas y propuestas para emprender procesos de desarrollo territorial rural*. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina, 132 p.
- Skelly, D.K. (1992) *Field evidence for a behavioral antipredator response in a larval amphibian*. *Ecology* 73: 704 - 708.
- Skelly, D.K. (1994) *Activity level and the susceptibility of anuran larvae to predation*. *Anim. Behav.* 47: 465 - 468.

- Skelly, D.K. (1997) *Tadpole communities*. Am. Sci. 85: 36 - 46.
- Smith, D.C. (1987) *Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis*. Ecology 68: 344 - 350.
- Sneath, P.H. y Sokal, R.R. (1973) *Numerical Taxonomy*.. Freeman, W.H & Co, San Francisco.
- Soldano, F. (1947) *Régimen y aprovechamiento de la red fluvial argentina*. Cimera, Buenos Aires.
- Sparling DW, Lowe TP, Pinkney AE (1997) *Toxicity of Abate® to green frog tadpoles*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58: 475 - 481.
- Sparling, D.W.; Linder, G.; Bishop, C.A. y Krest, S.K. (2010) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Spieler, M. (2003) *Risk of predation affects aggregation size: a study with tadpoles of Phrynomantis microps (Anura: Microhylidae)*. Anim. Behav. 65(1): 179 - 184.
- Spieler, M. (2005) *Can aggregation behaviour of Phrynomantis microps tadpoles reduce predation risk?* Herpetol. J. 15(3): 153 - 157.
- Stebbins, R.C. y Cohen, N.W. (1995) *A natural history of amphibians*. Princeton University Press, New Jersey.
- Stefanidou, M.; Athanaselis, S. y Spiliopoulou, H. (2009) *Butyrylcholinesterase: biomarker for exposure to organophosphorus insecticides*. Intern. Med. J. 39: 57 - 60.
- Storfer, A. (2003) *Amphibian declines: future directions*. Divers. Distrib. 9: 151 - 163.
- Strobbe, F.; McPeck, M.A.; De Block, M.; De Meester, L. y Stoks, R. (2009) *Survival selection on escape performance and its underlying phenotypic traits: a case of many-to-one mapping*. J. Evolution. Biol. 22: 1172 - 1182.
- Stuart, S.N.; Chanson, J.S.; Cox, N.A.; Young, B.E.; Rodrigues, A.S.L.; Fischman, D.L. y Waller, R.W. (2004) *Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide*. Science 306: 1783 - 1786.
- Sturm, A.; de Assis, H.C. y Hansen, P.D. (1999) *Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in biomonitoring of neurotoxic contamination*. Mar. Environ. Res. 47: 389 - 398.
- Sumanadasa, D.M.; Wijesinghe, M.R. y Ratnasooriya, W.D. (2008) *Effects of diazinon on survival and growth of two amphibian larvae*. J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka 36(2): 165 - 169.
- Szelenyi, J.G.; Bartha, E. y Hollan, S.R. (1982) *Acetylcholinesterase activity of lymphocytes: An enzyme characteristic of T-cells*. Br. R. Haematol. 50: 241 - 245.

- Tablado, A.; Oldani, N.O.; Ulibarrie, L. y Pignalberi de Hassan, C. (1988) *Cambios estacionales de la densidad de peces en una laguna del valle aluvial del río Paraná (Argentina)*. Rev. Hydrobiol. Trop. 21(4): 335 - 348.
- Takahara, T.; Kohmatsu, Y.; Maruyama, A. y Yamaoka, R. (2008) *Benefit of suites of defensive behavior induced by predator chemical cues on anuran tadpoles, Hyla japonica*. Behav. Ecol. Sociobiol. 63: 235 - 240.
- Taylor, M. (1913) *The development of Synbranchus marmoratus*. Quart. Jour. Micros. Sci. 59: 1 - 51.
- Tejedo, M. (2003) *El declive de los anfibios. La dificultad de separar las variaciones naturales del cambio global*. Munibe 16: 20 - 43.
- Teplitsky, C.; Piha, H.; Laurila, A. y Merilä, J. (2005) *Common pesticide increases costs of antipredator defenses in Rana temporaria tadpoles*. Environ. Sci. Technol. 39: 6079 - 6085.
- Teplitsky, C.; Plénet, S. y Joly, P. (2003) *Tadpole's responses to risk of fish introduction*. Oecologia 134: 270 - 277.
- Thompson, D.G.; Solomon, K.R. y Wojtaszek, B.F. (2006) *The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities*. Ecol. Appl. 16: 2022 - 2027.
- Thompson, H.M.; Walker, C.H. y Hardy, A.R. (1991) *Inhibition of avian esterase's by organophosphorus insecticides: problems of reactivation and storage*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 17: 379 - 386.
- Tockner, K.; Malard, F. y Ward, J.V. (2000) *An extension of the flood pulse concept*. Hydrol. Process. 14: 2861 - 2883.
- Treherne, J. E. y Foster, W. A. (1981) *Group transmission of predator avoidance behaviour in a marine insect: the Trafalgar effect*. Anim. Behav. 29: 911 - 917.
- Tscharntke, T.; Klein, A.M.; Kruess, A.; Steffan-Dewenter, I. y Thies, C. (2005) *Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity-ecosystem service management*. Ecol. Lett. 8: 857 - 874.
- Tu, H.T.; Silvestre, F.; Phuong, N.T. y Kestemont, P. (2010) *Effects of pesticides and antibiotics on penaeid shrimp with special emphases on behavioral and biomarker responses*. Environ. Toxicol. Chem. 29: 929 - 938.
- Tyler, M. J. (1997b). *Environmentally friendly: A false sense of security?* Species. Newsletter of the Species Survival Commission, IUCN, The World Conservation Union 29: 20 - 21.

Tyler, M.J. (1997a) *Herbicides kill frogs*. University of Adelaide, South Australia, Froglog: 21: 1.

US.EPA: United States Environmental Protect Agency. (1986) *Pesticide fact sheet: glyphosate. office of pesticide programs*, EPA Publication No. 540/FS-88-124, Washington, DC, USA.

US.EPA: United States Environmental Protect Agency. (1989) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to aquatic organisms. US Environmental Protection Agency Report No. EPA/600/4-89/001.

US.EPA: United States Environmental Protect Agency. (1991) Methods for measuring the acute toxicity of effluent and receiving waters to freshwater and marine organisms, 4ta ed., Weber, C.I. EPA-600/4-90-027.

US.EPA: United States Environmental Protect Agency. (2002) *Methods for evaluating wetland condition: using amphibians in bioassessments of wetlands*. U.S. Office of Water, Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA. EPA-822-R-02-022.

Vaira, Marcos; Baldo, D.; Barrasso, D.; Barrionuevo, S; Basso, N. ; Blotto, B.; Cairo, S.; Cajade, R.; Céspedes, J.; Corbalán, V.; Chilote, P.; Duré, M.; Falcione, C.; Ferraro, D.; Gutierrez, F.; Junges, C. M.; Lajmanovich, R.; Lescano, J.N.; Marangoni, F.; Martinazzo, L.; Marti, L.; Moreno, L.; Natale, G.; Pérez Iglesias, J.M.; Peltzer, P.; Quiroga, L.; Rosset, S.; Sanabria, E.; Sanchez, L.; Schaefer, E.; Úbeda, C. y Zaracho, V. (2012) *Categorización del estado de conservación de los Anfibios de la República Argentina*. Cuad. Herpetol. (Supl. 1): 131 - 159.

Van Buskirk, J. (2000) *The costs of an inducible defense in anuran larvae*. Ecology 81: 2813 - 2821.

Van Buskirk, J. (2002) *A comparative test of the adaptive plasticity hypothesis: relationships between habitat and phenotype in anuran larvae*. Am. Nat. 160: 87 - 102.

Van Buskirk, J. y McCollum, S.A. (2000) *Functional mechanisms of an inducible defense in tadpoles: morphology and behaviour influence mortality risk from predation*. J. Evolution. Biol.13: 336 - 347.

Van Buskirk, J. y Relyea, R.A. (1998) *Selection for phenotypic plasticity in *Rana sylvatica* tadpoles*. Biol. J. Linn. Soc. 65: 301 - 328.

Van Buskirk, J.; Anderwald, P.; Lüpold, S.; Reinhardt, L. y Schuler, H. (2003) *The lure effect, tadpole tail shape, and the target of dragonfly strikes*. J. Herpetol. 37(2): 420 - 424.

Van Buskirk, J.; McCollum, S.A. y Werner, E.E. (1997) *Natural selection for environmentally induced phenotypes in tadpoles*. Evolution 51: 1983 - 1992.



- Van der Oost, R.; Beyer, J. y Vermeulen, N.P.E. (2003) *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. Environm. Toxicol. Pharmacol. 13: 57 - 149.
- Van Gossum, H.; Bots, J.; Snijkers, T.; Meyer, J.; Van Wassenbergh, S.; De Coen, W. y De Bruyn, L. (2009) *Behaviour of damselfly larvae (Enallagma cyathigerum) (Insecta, Odonata) after long-term exposure to PFOS*. Environ. Pollut. 157: 1332 - 1336.
- Vasseur, P. y Cossu-Leguille, C. (2003) *Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety*. Environ. Int. 28: 711 - 717.
- Vaz-Ferreira, R. y Gehrau, A. (1975) *Comportamiento epimeletico de la Rana comun, Leptodactylus ocellatus (L.) (Amphibia, Leptodactylidae). Atención de la cria y actividades alimentarias y agresivas relacionadas*. Physis Sec. B. 34(88): 1 - 14.
- Vaz-Ferreira, R. y Gehrau, A. (1986) *Comportamiento de los renacuajos gregarios de Leptodactylus ocellatus*. Montevideo, Dirección General de Extensión Universitaria, División Publicaciones y Ediciones, 23 p.
- Vaz-Ferreira, R.; Oimos, A. y Stagi, A. (1995) *Canibalismo y comportamiento epimeletico en Leptodactylus ocellatus, "Rana Criolla"*. Resúmenes de las VII Jornadas Científicas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Piriápolis, Uruguay, p. 98.
- Venkateswara Rao, J.; Begum, G.; Chakra Reddy, N. y Sridhar, V. (2005c) *Sub-lethal effects of monocrotophos on locomotor behaviour and gill architecture of the mosquito fish, Gambusia affinis*. J. Environ. Sci. Health B 40: 813 - 826.
- Venkateswara Rao, J.; Begum, G.; Pallela, R.; Usman, P.K. y Nageswara Rao, R. (2005b) *Changes in behaviour and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, Gambusia affinis in response to the sub-lethal exposure to chlorpyrifos*. I. J. Environ. Res. Pub. Health 2: 478 - 483.
- Venkateswara Rao, J.; Parvati, K.; Kavitha, P.; Jakka, N.M. y Pallela, R. (2005a) *Effect of chlorpyrifos and monocrotophos on locomotor behaviour and acetylcholinesterase activity of subterranean termites, Odontotermes obesus*. Pest. Manage. Sci. 61: 417 - 421.
- Venturino, A. y Pechen de D'Angelo, A.M. (2005) *Biochemical targets of xenobiotics: biomarkers in amphibian ecotoxicology*. Appl. Herpetol. 2: 335 - 353.
- Venturino, A.; Rosenbaum, E.; De Castro, A.C.; Anguiano, O.L.; Gauna, L.; De Schroeder, T.F. y Pechen de D'Angelo, A.M. (2003) *Biomarkers of effect in toads and frogs*. Biomarkers 8: 167 - 186.
- Vera Candiotti, F.; Haad, B.; Baldo, D.; Kolenc, F.; Borteiro, C. y Altig, R. (2011) *Different pathways are involved in the early development of the transient oral apparatus in anuran tadpoles (Anura: Leiuperidae)*. Biol. J. Linn. Soc. 104(2): 330 - 345.

- Vera Candiotti, J.; Natale, G.S.; Soloneski, S.; Ronco A.E. y 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: 249 - 255.
- Vera Candiotti, M.F. (2006) *Ecomorphological guilds in anuran larvae: an application of geometric morphometric methods*. Herpetol. J. 16: 149 - 162.
- Vera Candiotti, M.F. (2007) *Anatomy of anuran tadpoles from lentic water bodies: systematic relevance and correlation with feeding habits*. Zootaxa 1600: 1 - 175.
- Vera Candiotti, M.F. y Altig, R. (2010) *A survey of shape variation in keratinized labial teeth of anuran larvae as related to phylogeny and ecology*. Biol. J. Linn. Soc. 101(3): 609 - 625.
- Viglizzo, E.F.; Carreño, L.V.; Preyra, H.; Ricard, F.; Clatt, J. y Pincén, D. (2010) *Dinámica de la frontera agropecuaria y cambio tecnológico*. En: *Expansión de la frontera agropecuaria en Argentina y su impacto ecológico-ambiental*. (Eds.: Viglizzo, E.F. y Jobbágy, E.). Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina, p. 17 - 22.
- Wake D.B. y Vredenburg V.T. (2008) *Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 11466 - 11473.
- Walker, C.H. y Thompson, H.M. (1991) *Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases*. En: *Cholinesterase inhibiting insecticides: their impact on wildlife and the environment*. (Ed.: Mineau, P.), Vol II, Elsevier, New York, p. 1 - 18.
- Wallace, K. y Herberz, U. (1988) *Reactivation and aging of phosphorylated brain acetylcholinesterase from fish and rodents*. Appl. Pharmacol. 92: 307 - 314.
- Ward, J.V. (1998) *Riverine landscapes: biodiversity patterns, disturbance regimes, and aquatic conservation*. Biol. Conserv. 83: 269 - 278.
- Wassersug, R. (1971) *On the comparative palatability of some dry-season tadpoles from Costa Rica*. Am. Midl. Nat. 86: 101 - 109.
- Wassersug, R.J. (1992) *The basic mechanics of ascent and descent by anuran larvae (Xenopus laevis)*. Copeia, 1992: 890 - 894.
- Wassersug, R.J. y Feder, M.E. (1983) *The effects of aquatic oxygen concentration, body size and respiratory behaviour on the stamina of obligate aquatic (Bufo americanus) and facultative air-breathing (Xenopus laevis and Rana berlandieri) anuran larvae*. J. Exp. Biol. 105: 173 - 190.
- Wassersug, R.J. y Seibert, E. (1975) *Behavioral responses of amphibian larvae to variation in dissolved oxygen*. Copeia 1975: 86 - 103.

- Webber, N.R.; Boone, M.D. y Distel, C.A. (2010) *Effects of aquatic and terrestrial carbaryl exposure on feeding ability, growth, and survival of American toads*. Environ. Toxicol. Chem. 29: 2323 - 2327.
- Weis, J.S.; Bergey, L.; Reichmuth, J. y Candelmo, A. (2011) *Living in a contaminated estuary: behavioral changes and ecological consequences for five species*. Bioscience 61: 375 - 385.
- Weis, J.S.; Smith, G.; Zhou, T.; Santiago-Bass, C. y Weis, P. (2001) *Effects of contaminants on behaviour: biochemical mechanisms and ecological consequences*. Bioscience 51: 209 - 217.
- Welcome, R.L. (1992) *Pesca fluvial*. FAO. Roma. Documento técnico de pesca No. 262, 303 p.
- Werner, E.E. y Anholt, B.R. (1993) *Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality rates mediated by foraging activity*. Am.Nat. 142: 2442 - 2472.
- Werner, E.E. y McPeck, M.A. (1994) *Direct and indirect effects of predators on two anuran species along an environmental gradient*. Ecology 75: 1368 - 1382.
- Wheelock, C.E.; Miller, J.L.; Miller, M.G.; Shan, G.; Gee, S.J. y Hammock, B.D. (2004) *Development of toxicity identification evaluation (TIE) procedures for pyrethroid detection using esterase activity*. Environ. Toxicol. Chem. 11: 2699 - 2708.
- Wheelock, C.E.; Phillips, B.M.; Anderson, B.S.; Miller, J.L., Miller, M.J. y Hammock, B.D. (2008) *Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs)*. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 195: 117 - 178.
- Whitfield, D.P. (2003) *Redshank Tringa totanus flocking behaviour, distance from cover and vulnerability of sparrowhawk Accipiter nisus predation*. J. Avian Biol. 34: 163 - 169.
- WHO (1994) *Environmental Health Criteria 159. Glyphosate*. Geneva: United Nations Environmental Programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization, p. 177.
- WHO/FAO: World Health Organization/Food and Agriculture Organization (1996) *Data sheets on pesticides*. No 91. Glyphosate. WHO/ PCS/DS/96.91.
- Widder, P.D. y Bidwell, J.R. (2006) *Cholinesterase activity and behavior in chlorpyrifos-exposed Rana sphenocephala tadpoles*. Environ. Toxicol. Chem. 25(9): 2446 - 2454.
- Widder, P.D. y Bidwell, J.R. (2008) *Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos*. Aquat. Toxicol. 88: 9 - 18.
- Wilbur, H.M. (1980) *Complex life cycles*. Annu. Rev. Ecol. Syst. 11: 67 - 93.

- Wilbur, H.M. (1987) *Regulation of structure in complex systems: experimental temporary pond community*. Ecology 53: 3 - 21.
- Williams, B.K. y Semlitsch, R.D. (2010) *Larval responses of three midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58 (3): 819 - 827.
- Williams, G.M.; Kroes, R. y Munro, I.C. (2000) *Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans*. Regul. Toxicol. Pharmacol. 31: 117 - 165.
- Williams, J. y Gudynas, E. (1987) *Descripción de la larva de Elachistocleis bicolor (Valenciennes, 1838) (Anura: Microhylidae)*. Amphibia-Reptilia 8: 225 - 229.
- Wogram, J.; Sturm, A.; Segner, H. y Liess, M. (2001) *Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus) following short-term exposure*. Environ. Toxicol. Chem. 20(7): 1528 - 1531.
- Wojtaszek, B.F.; Staznik, B.; Chartrand, D.T.; Stephenson, G.R. y Thompson, D.G. (2004) *Effects of Vision® herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands*. Environ. Cont. Toxicol. 23: 832 - 842.
- Wolf, G.; Scheunders, P. y Selens, M. (1998) *Evaluation of swimming activity of Daphnia magna by image analysis after administration of sublethal cadmium concentrations*. Comp. Biochem. Phys. A 120: 99- 105.
- Wyman, R.L. (1990) *What is happening to the amphibians?* Conserv. Biol. 4: 350 - 352.
- X**uereb, B., Chaumot, A.; Mons, R.; Garric, J. y Geffard, O. (2009) *Acetylcholinesterase activity in Gammarus fossarum (Crustacea amphipoda) Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys*. Aquat. Toxicol 93: 225 - 233.
- Z**ar, J.H. (1996) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Zinkl, J.G.; Lockhart, W.L.; Kenny, S.A. y Ward, F.J. (1991) *The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish*. En: *Cholinesterase-inhibiting insecticides. Their impact on wildlife and the environment* (Ed.: Mineau, P.), Elsevier, New York. p. 234 - 243.