Naturalis
Repositorio Institucional
http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Influencia de perturbaciones ambientales de origen antrópico sobre el ciclo de vida de Chordodes nobilii [Gordiida, Nematomorpha]

Achiorno, Cecilia Luján
Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Ferrari, Lucrecia
Co-dirección: Villalobos, Cristina de

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2011

Acceso en:
http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20120126001072

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Naturalis Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP

Influencia de perturbaciones ambientales de origen antrópico sobre el ciclo de vida de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha).

Tesista: Cecilia L. Achiorno

Directora: Lucrecia Ferrari

Co-Directora: Cristina de Villalobos

Influencia de perturbaciones ambientales de origen antrópico sobre el ciclo de vida de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha).

Tesis para acceder

al grado de

Doctor en Ciencias Naturales

Autor: Cecilia Luján Achiorno

Directora: Lucrecia Ferrari

Co-Directora: Cristina de Villalobos

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Universidad Nacional de La Plata

Lugar de trabajo: Unidad de Servicios en Bioensayos y Diagnósticos Ecotoxicológicos (SERByDE), Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA), Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Lujan.

2010

A mi familia,

y a todos aquellos que creen

que los sueños pueden hacerse realidad

y luchan por ellos

AGRADECIMIENTOS

Estoy finalizando esta etapa de mi vida, y se agolpan los nombres de las personas a quienes quiero agradecer.

A mis directoras por su apoyo durante esta etapa de mi vida. A Cristina que realizó la primer pregunta que llevó a la realización de esta tesis, y que confió en mí para desarrollarla. A Lucrecia que aceptó este desafío y que también confió en mí para realizar esta investigación. Me siento privilegiada por las dos personas que dirigieron mis pasos en esta etapa. Desde el inicio estuvieron a mi lado, guiándome, respondiendo mis preguntas, con gran paciencia y predisposición me brindaron sus conocimientos, transformándose en mis amigas. No existen palabras para agradecerles el tiempo dedicado a esta tesis, que creyeran en mí, que me alentaran, que estuvieran a mi lado, y no solamente durante el desarrollo de esta investigación, sino en cada momento importante de mi vida. Gracias infinitas.

A la facultad de Ciencias Naturales y Museo y al PRODEA, por facilitarme las instalaciones y los medios para la realización de la Tesis. A Verónica, Diego, Adonis, Alfredo, Anabella, Bety, Carolina, Fernando, Laura, Martina, Natalia, Paola, Patricia, Paula, mis compañeros en el PRODEA y el SERByDE, por su ayuda continua. Especialmente a Carolina Vilches y a Paula, que me ayudaron muchas, muchas veces en las mediciones que se realizaron en el laboratorio.

A Juan García y a Susana Licastro, ya que gracias a ellos pude obtener las larvas de *Aedes aegypti* necesarias para la realización de los bioensayos.

A CONICET por sus becas

A mi familia, que me apuntaló desde el momento que decidí estudiar biología. Estuvieron a mi lado durante toda la carrera de grado y durante el tiempo que llevó la realización de esta tesis, dándome aliento a cada paso. A mis padres, Gerardo y Graciela, que sabiendo que no volvería a Olavarría si quería seguir mis sueños, me ayudaron de mil y una maneras para poder cumplirlos. A mi hermana Evangelina, que también vino a estudiar a La Plata y compartió muchos momentos, de certidumbre y de incertidumbre, pero siempre tuvo una palabra de aliento. A mis

abuelas, a mis tíos Daniel y Marta, a mis primos, todos y cada uno me ayudaron a avanzar en esta etapa.

A mis amigos, que son un pilar importantísimo, con sus consejos y su ayuda continua, y sin los que seguramente hubiera resultado mucho más difícil llevar a cabo este proyecto; y que comparten mis alegrías y tristezas con la misma predisposición. Muchos de los cuales me acompañan desde el primer día del curso de ingreso, que ahora se ve tan lejano.

A Germán, que supo apoyarme durante estos años, por su paciencia, su ayuda constante y sus consejos para con mi trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

SECCIÓN I INTRODUCCIÓN

RESUMEN ..... ***I***

ABSTRACT ..... ***IV***

CAPÍTULO I SOBRE LA ESPECIE DE ESTUDIO: Chordodes nobilii ***1***

ALGUNAS CONSIDERACIONES BIOLÓGICAS SOBRE LOS ESTADIOS DE VIDA DE GORDIIDA 1

EMBRIONES 1

LARVAS 2

JUVENILES 3

ADULTOS 3

CICLO BIOLÓGICO 5

RESEÑA HISTÓRICA Y ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO DE LOS GORDIIDA 8

CAPÍTULO II MARCO CONCEPTUAL: EL AGUA, LA CONTAMINACIÓN Y LA ECOTOXICOLOGÍA ***12***

CAPÍTULO III PARÁSITOS: ¿INDICADORES DE POLUCIÓN? ***22***

CAPÍTULO IV ANTECEDENTES ECOTOXICOLÓGICOS ***28***

CAPÍTULO V DISTRIBUCIÓN DE Chordodes nobilii ***31***

DISTRIBUCIÓN DE *Chordodes nobilii* EN ARGENTINA 31

ÁREA DE COLECTA DE *Chordodes nobilii* 31

CLIMA 33

CUENCA DEL RÍO SAUCE GRANDE 33

USO DEL SUELO EN LA ZONA DE ESTUDIO 38

CAPÍTULO VI FUNDAMENTOS DE LA ELECCIÓN DEL TEMA ***41***

SECCIÓN II HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

CAPÍTULO I PLANTEO DE HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ***44***

OBJETIVOS 44

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS ***46***

METODOLOGÍA EN EL TRABAJO DE CAMPO 46

METODOLOGÍA EN EL TRABAJO DE LABORATORIO 47

Mantenimiento de los individuos colectados en el campo 47
Medición de parámetros físico-químicos de agua y sedimento del río Sauce Grande (SG) 48
BIOENSAYOS 48
DISEÑO DE LOS PROTOCOLOS DE ENSAYO..... 48
BIOENSAYOS CON EMBRIONES 49
BIOENSAYOS CON LARVAS..... 51
BIOENSAYOS CON ADULTOS 53
BIOENSAYOS REALIZADOS CON TÓXICOS 54
Bioensayos con Embriones y Larvas:..... 54
Bioensayos con Adultos: 54
Tóxicos ensayados 55
PUNTOS FINALES 58
BIOENSAYOS PARA EVALUAR TOLERANCIA TÉRMICA 58
EVALUACIÓN ESTADÍSTICA..... 59
SECCIÓN III RESULTADOS
Consideraciones acerca de la Sección III Resultados 60
CAPÍTULO I ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE LAS LARVAS DE Chordodes nobilii 61
INTRODUCCIÓN 61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 61
CAPÍTULO II EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE Chordodes nobilii A TRES PLAGUICIDAS..... 66
INTRODUCCIÓN 66
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 72
CAPÍTULO III EFECTO DEL AGUA DEL RÍO SAUCE GRANDE SOBRE LA TOXICIDAD DE LOS PLAGUICIDAS EN Chordodes nobilii..... 85
INTRODUCCIÓN 85
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 87
Comparaciones de efecto del medio (SG vs EPA) 91
CAPÍTULO IV VALIDACIÓN DE LOS PROTOCOLOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS CON LOS ESTADIOS PREPARASITARIOS DE Chordodes nobilii: SENSIBILIDAD A TRES TÓXICOS REFERENTES 97
INTRODUCCIÓN 97

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 101
CAPÍTULO V EXPOSICIÓN A TEMPERATURAS EXTREMAS..... 111
INTRODUCCIÓN 111
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 113
SECCIÓN IV DISCUSIÓN FINAL Y CONCLUSIONES
DISCUSIÓN FINAL 117
Obtención de una línea de base para la capacidad infectiva de esta especie. 117
Diseño del protocolo de ensayo adecuado para los Gordiida, selección de los puntos finales. 118
Evaluación mediante bioensayos del efecto de contaminantes sobre *Chordodes nobilii*..... 120
Establecimiento del rango de tolerancia térmica en las etapas de vida libre de *Chordodes nobilii*. 123
Determinación de la capacidad de *C. nobilii* de actuar como bioindicadora de contaminación. 123
CONCLUSIONES..... 127
APÉNDICE I PARASITISMO..... 129
APÉNDICE II RESULTADOS ESTADÍSTICOS Y TABLAS POST HOC..... 131
Capítulo I Análisis de la capacidad infectiva de las larvas de *C. nobilii*..... 131
Capítulo II Plaguicidas 132
Capítulo III Efecto del agua del río sauce grande sobre la toxicidad de los plaguicidas en *Chordodes nobilii*..... 139
Capítulo IV Tóxicos Referentes..... 147
Capítulo V Temperatura..... 151
Análisis de Regresión 152
APÉNDICE III PRODUCCIÓN CIENTÍFICA 153
BIBLIOGRAFÍA..... 156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.1.1	Embriones de *Chordodes nobilii*……..	2
1.1.2	Larvas de *Chordodes nobilii*……..	2
1.1.3	Adultos de *Chordodes nobilii*……...	4
1.1.4	Ciclo de vida de los Gordiida……...	8
1.5.1	Ubicación de cuenca del río Sauce Grande……..	34
1.5.2	Ubicación cuenca alta del río Sauce Grande……	35
1.5.3	Vista satelital de la zona de muestreo……	36
1.5.4	Arroyo Rivera……..	37
1.5.5	Arroyo Piedra azul aguas arriba……..	38
1.5.6	Desembocadura del arroyo Piedra azul en el arroyo El negro……...	39
1.5.7	Arroyo El Negro……..	40
2.2.1	Colecta de adultos…….	47
2.2.2	Hembra realizando la oviposición……...	48
2.2.3	Esquema del desarrollo de los bioensayos……...	52
2.2.4	Larvas de *Aedes aegypti* infectadas con larvas de *Chordodes nobilii*……...	53
2.2.5.	Recambio del medio de ensayo por medio control……..	54
3.1.1.	Análisis de frecuencia para la variable IIMA…….	62
3.1.2.	IIMA según condiciones de desarrollo embrionario……	64
3.1.3.	IIMA según el medio de ensayo……..	64
3.1.4.	IIMA según la hembra de la cual provenían los huevos……..	65
3.2.1.	ENV expuestos a Malation (medio de dilución agua EPA)….	73
3.2.2.	IIMA-E e IIMA-L para Glifosato (medio de dilución agua EPA)…….	74
3.2.3	IIMA-E e IIMA-L para Carbendazim (medio de dilución agua EPA)……..	75
3.2.4	IIMA-E e IIMA-L para Malatión (medio de dilución agua EPA)……...	75
3.2.5.	Larvas eclosionadas de huevos en control y expuestos a Malatión…….	81

Índice Figuras (Continuación)

3.3.1. ENV expuestos a Carbendazim (medio de dilución SG)…….. 88

3.3.2. IIMA-E e IIMA-L para Glifosato (medio de dilución SG)…… 89

3.3.3 IIMA-E e IIMA-L para Carbendazim (medio de dilución SG)… 90

3.3.4 IIMA-E e IIMA-L para Malatión (medio de dilución SG)…… 90

3.3.5. Comparación de tratamientos para ENVr. Bioensayos de Carbendazim en medio EPA y SG…… 91

3.3.6. Comparación de tratamientos para ENVr. Bioensayos de Malation en medio EPA y SG…… 92

3.3.7. Comparación de tratamientos para IIMA-Er. Bioensayos de Glifosato en medio EPA y SG…… 92

3.3.8. Comparación de tratamientos para IIMA-Er. Bioensayos de Carbendazim en medio EPA y SG…… 93

3.3.9. Comparación de tratamientos para IIMA-Er. Bioensayos de Malation en medio EPA y SG…… 94

3.3.10. Comparación de tratamientos para IIMA-Lr. Bioensayos de Glifosato en medio EPA y SG…… 94

3.3.11. Comparación de tratamientos para IIMA-Lr. Bioensayos de Carbendazim en medio EPA y SG…… 95

3.3.12. Comparación de tratamientos para IIMA-Lr. Bioensayos de Malation en medio EPA y SG…… 95

3.4.1. ENV expuestos a Cromo…… 101

3.4.2. Larva eclosionada de huevos expuestos al Cr^{+6} con malformaciones…… 102

3.4.3 IIMA-E e IIMA-L para DSS..... 103

3.4.4 IIMA-E e IIMA-L para Cd..... 103

3.4.5 IIMA-E e IIMA-L para Cr..... 104

3.5.1. Exposición de embriones a temperaturas extremas…….. 113

3.5.2. IIMA-L de larvas expuestas a temperaturas extremas..... 114

3.5.3. Supervivencia de adultos expuestos a temperturas bajo cero. 114

3.5.4. Mortalidad acumulada de adultos expuestos a 38.5-40.5 ºC... 115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.1.1.	Especies de gordiidos en hospedadores colectados en campo……..	9
1.1.2.	Infecciones experimentales……..	10
1.1.3.	Hospedadores de larvas de Gordiida indeterminadas.....	11
1.3.1.	Efectos de contaminación en diferentes taxa de parásitos…….....	23
1.3.2.	Respuestas de los distintos niveles de organización a los cambios en la calidad ambiental……..…….....	25
1.5.1.	Porcentaje de utilización de tecnologías en actividades agrícolas y ganaderas……...	39
2.2.1	Resumen de las condiciones de evaluación en la realización de los bioensayos con estadios preparasitarios de *Chordodes nobilii*……	56
2.2.2.	Concentraciones nominales y analíticas de las soluciones madre……	57
2.2.3.	Concentraciones nominales de las soluciones ensayadas……	57
2.2.4.	Temperaturas ensayadas…….	58
3.1.1	Estadísticos descriptivos para el índice de infección IIMA de controles	62
3.1.2	Condiciones bajo las que se llevó a cabo el desarrollo embrionario…	63
3.2.1.	Concentraciones efectivas de los plaguicidas evaluados……	72
3.2.3.	Concentración Inhibitoria media obtenida para los plaguicidas evaluados…….	76
3.2.4.	Sensibilidad de distintos organismos al Glifosato……..	77
3.2.5.	Sensibilidad de distintos organismos al Carbendazim……..	78
3.2.6.	Sensibilidad de distintos organismos al Malation……...	79
3.2.7	Parámetros considerados para los plaguicidas evaluados (TD_{50}, CI_{50}, NGPVA, CAE)……	84
3.3.1.	Concentraciones comparables entre medios de ensayo para los plaguicidas……...	86
3.3.2.	Parámetros físicos-químicos medidos en el río Sauce Grande…….	86
3.3.3	Parámetros físico-químicos medidos en laboratorio de muestras del río Sauce Grande……...	87
3.3.4	Valores para pH, Dureza y Conductividad de los medios de ensayo…	87

3.3.5 Concentración Inhibitoria media para los plaguicidas en medio de dilución SG…….. 90
3.4.1. Concentraciones ensayadas para los tóxicos referentes…… 100
3.4.2 Concentración Inhibitoria media para los tóxicos referentes…… 102
3.4.3. Sensibilidad al DSS para diferentes organismos…….. 106
3.4.4. Sensibilidad al Cd para diferentes organismos…… 107
3.4.5. Sensibilidad al Cr para diferentes organismos…….. 109
3.5.1. Temperaturas evaluadas en los bioensayos…… 112
4.1.1. Resumen de los resultados obtenidos a partir de los bioensayos realizados con tóxicos en esta Tesis…… 121
4.1.2. Requisitos de una especie bioindicadora, su estado en *C. nobilii* 125

RESUMEN

La especie estudiada, *Chordodes nobilii,* pertenece al Phylum Nematomorpha, Clase Gordiida. El ciclo de vida de esta clase presenta tres fases: preparasitaria (larvas de vida libre), parasitaria (juvenil) y postparasitaria (adultos de vida libre). Los adultos se reúnen a copular en los ambientes de agua dulce en los que viven formando los llamados “nudos gordianos”. Las hembras ya fecundadas se alejan y depositan los huevos sobre diferentes sustratos, en forma de cordones de aspectos diversos, dependiendo de la especie. Las larvas tienen poca movilidad al eclosionar y suelen mantenerse cerca de los cordones de huevos. La supervivencia larval depende del encuentro con un hospedador, contando para ello de un periodo de tiempo relativamente breve. Los hospedadores pueden ser paraténicos o definitivos (estos últimos son principalmente insectos terrestres). Si bien existen numerosos estudios sobre estos vermes, aún hay aspectos sobre su biología que se desconocen, siendo éste el primer estudio ecotoxicológico para el *Phylum*.

Considerando que en la cuenca del río Sauce Grande (Sierra de la Ventana, Provincia de Buenos Aires) se ha observado una disminución en la abundancia y diversidad de gordiidos y que no existe información previa sobre el efecto de los contaminantes sobre el ciclo vital del grupo, el objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de distintas variables (ambientales y antrópicas) sobre el ciclo de vida de *Chordodes nobilii.* Los estudios realizados se basaron en la hipótesis de que los Gordiida son vulnerables a la disminución de la calidad del agua de su hábitat.

El estrés ambiental afecta su capacidad de infección y su abundancia en los ambientes acuáticos donde habitan, alterando así el desarrollo normal del grupo.

Se propuso como objetivos la evaluación del efecto de contaminantes de origen antrópico y del rango de tolerancia térmica en las distintas etapas de vida libre (embriones, larvas y adultos) de *C. nobilii*.

Se diseñó un protocolo de ensayo para cada una de estas etapas, seleccionándose puntos finales compatibles con su ciclo de vida. En el diseño de los bioensayos se consideró la particularidad de que los gordiidos, desde el enfoque ecológico, no son consumidores. Además, como parásitos, podrían representar un nexo entre los ambientes acuáticos y terrestres.

Los protocolos desarrollados contemplaron una exposición temporalmente restringida de 96 horas para adultos y embriones (expuestos desde el estadio de

blástula) y de 48 horas para larvas. El tiempo de exposición de los embriones representa aproximadamente un 15% del tiempo necesario para que la blástula alcance el estado de larva libre. El protocolo con larvas contempló un tiempo de exposición breve debido a que éstas deben rápidamente encontrar un hospedador para sobrevivir.

Se fijaron tres puntos finales: proporción de embriones no viables (ENV), capacidad infectiva de las larvas eclosionadas de huevos expuestos (IIMA-E) y la supervivencia larval a través de su capacidad infectiva (IIMA-L). Para los dos últimos se utilizó un índice que evalúa la capacidad infectiva en parásitos. El ensayo con embriones es capaz de distinguir efectos subletales (IIMA-E).

Se determinó una línea de base para la capacidad infectiva de *Chordodes nobilii* y la sensibilidad de la misma a 7 tóxicos y a temperaturas extremas. Se seleccionaron tres plaguicidas: Glifosato (como ingrediente activo y como formulado), Carbendazim (ingrediente activo) y Malatión (formulado). Además se seleccionaron tres tóxicos referentes reconocidos: el detergente Dodecil Sulfato de Sodio y dos metales pesados, Cloruro de Cadmio y Dicromato de Potasio. También se evaluó el efecto de los plaguicidas en agua de su medio natural (río Sauce Grande) y se comparó con la respuesta en medio artificial (agua dulce reconstituida).

Los resultados obtenidos mostraron que, en *C. nobilii,* la capacidad infectiva tiene una gran variabilidad individual (dependiente de la hembra). Asimismo, la especie presenta una sensibilidad elevada a los tóxicos evaluados y un amplio rango de tolerancia térmica. Aunque los puntos finales en base a la capacidad infectiva usados en esta Tesis no fueron fácilmente comparables con los obtenidos para otras especies, sí permitieron establecer la sensibilidad de *C. nobilii* para un tóxico dado respecto de otros organismos acuáticos. También fue posible obtener a partir de los puntos finales una concentración inhibitoria o efectiva, la que permitió determinar en cada estadio el orden de toxicidad de los poluentes y la sensibilidad diferencial por estadío. Estos puntos finales demostraron ser repetibles y confiables.

Cuando el medio de dilución fue agua reconstituida, el desarrollo embrionario fue inhibido sólo por Cromo (CI_{50}-96 h de 0.71 mg/L), en tanto que el Malatión generó un aumento significativo del número de embriones no viables sólo a la máxima concentración ensayada (0.22 mg Mal/L). Cuando el medio de ensayo fue

agua del medio natural, sólo el Carbendazim determinó inhibición del desarrollo embrionario (CI_{50}-96 h de 0.032 mg/L).

En todos los casos, cuando el medio de ensayo fue agua reconstituida, la capacidad infectiva de las larvas que lograron eclosionar de los huevos expuestos y de las larvas expuestas se vio afectada significativamente respecto de sus controles desde la menor concentración ensayada. En el caso de los plaguicidas, este efecto fue detectable a concentraciones esperables en el ambiente. Se pudo determinar que el Carbendazim resulta el contaminante más tóxico para embriones y larvas. Al considerar el efecto del medio sobre la sensibilidad de *C. nobilii* a los plaguicidas se determinó que el efecto depende del pesticida y no del medio de ensayo.

A partir de los resultados obtenidos durante el periodo experimental, se pudo concluir que los estadios preparasitarios de *C. nobilii* han demostrado ser sensibles a los siete tóxicos evaluados en las condiciones planteadas para la realización de los bioensayos. Por lo tanto, los protocolos diseñados para tal fin fueron factibles de realización, repetibles y confiables y, por consiguiente, han sido validados para la evaluación ecotoxicológica de especies de Gordiida.

C. nobilii presenta muchos de los requisitos necesarios para ser considerada una especie bioindicadora. Hasta ahora se ha comprobado que la especie de estudio tiene un amplio rango de tolerancia térmica y se han realizado crías en laboratorio exitosas para otras especies de la clase Gordiida. También se están realizando trabajos de investigación sobre la ecología de diversas especies, tanto en el hemisferio norte como en Argentina.

Los resultados obtenidos en esta Tesis, sumados al valor ecológico de *C. nobilii* (que enlazan ecosistemas terrestres y acuáticos y ocupan distintos niveles en la red trófica), fortalecen la postura de considerar a esta especie útil en la realización de evaluaciones ecotoxicológicas.

Finalmente, se considera que este es un aporte valioso a la ecotoxicología regional, principalmente, porque aborda el uso de una especie nativa y parásita. Estudios con otros enfoques, como es el caso de esta Tesis, pueden ser de utilidad para realizar evaluaciones ecotoxicologías que cubran mayores espectros dentro del ambiente, permitiendo perfeccionar los modelos predictivos y colaborar con la generación de leyes que protejan el medio y sus habitantes.

ABSTRACT

The studied species, *Chordodes nobilii*, belongs to the Phylum Nematomorpha, class Gordiida. The life cycle of this class presents three phases: preparasitic (free-living larvae), parasitic (juveniles) and postparasitic (free-living adults). Adults gather to mate in the freshwater environments they inhabit, tying themselves in knots called “gordian knots”. Females, once inseminated, leave and lay the eggs on different substratums, in diverse looking strings according to the species. Larvae have little mobility after hatching and tend to keep close to the egg strings. Larval survival depends on encountering a host, counting with a short period of time to do this.

Hosts can be paratenic or definitive - the latter, mainly terrestrial insects. Although several studies have been conducted on these worms, there are still aspects on their biology that remain unknown, being this the first ecotoxicological study for this phylum.

Considering that there has been a noted decrease in the amount and diversity of gordiidos in the Sauce Grande river basin (Sierra de la Ventana, Buenos Aires) and that there is no prior information about the effect of contaminants on the life cycle of the group, the aim of this thesis was to evaluate the effect of different variables (environmental and antropic) about the life cycle of *Chordodes nobilii*. The conducted studies were based on the hypothesis of Gordiida being vulnerable to decreases in the quality of the water they inhabit.

Environmental stress affects their infective capacity and their numbers in their aquatic habitat.

The evaluation of the effects of contaminants of antropic origin and of the range of termic tolerance in the different free-living stages (embryos, larvae and adults) of C. nobilii was proposed as aim of this thesis.

An assay protocol was designed for each of these stages, selecting end points compatible with their life cycle. During the design of the bioassay, the fact that gordiidos, from an ecological point of view, are not consumers. What is more, as parasites, they could represent a link between aquatic and terrestrial environments.

Conducted protocols included temporally restrained exposure of 96 hours for adults and embryos (exposed since blastula stage) and 48 hours for larvae. The time

of exposure for embryos represents approximately 15% of the time needed for the blastula to reach the free-living larva state. Protocol with larvae included a small time of exposure due to the fact that these need to find a host quickly in order to survive.

Three end points were set: non-viable embryo proportion (ENV), infective capacity of larvae hatches from exposed eggs (IIMA-E) and larval survival through their infective capacity (IIMA-L). For the last two, an index which evaluates infective capacity of parasites was used. The assay with embryos can make out sublethal effects (IIMA-E).

A base line for infective capacity of *Chordodes nobilii* was determined, as well as its sensitivity to 7 toxics and extreme temperatures. Three pesticides were selected: Glyphosate, (as active ingredient and as formulated), Carbendazim (active ingredient) and Malathion (formulated). In addition, three recognized referential toxics: the detergent Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), and two heavy metals, Cadmium, as cadmium chloride, and Chromium, as potassium dichromate. The effect of pesticides in water of their natural environment (Sauce Grande river) was evaluated and compared with response in artificial environment (reconstituted freshwater).

Obtained results show that, for *C. nobilii*, infective capacity varies largely between individuals (depending on the female). Also, the species presents high sensitivity to the used toxics and a wide range of termic tolerance. Although the end points based on infective capacity used for this thesis were not easily comparable to those obtained for other species, they did make it possible to establish the sensitivity of *C. nobilii* to a given toxic with respect to other aquatic organisms. It was also possible to obtain from the end points, an inhibitory or effective concentration, which allowed to determine the order of toxicity de los poluentes and differential sensitivity for each stage. These end points proved to be repeatable and reliable.

When the test media was reconstituted hard water, the embryonic development was inhibited only by Chromium (CI_{50}-96 h de 0.71 mg/L), whereas Malathion generated a significant increase in the non viable embryos number only at the highest concentration tested (0.22 mg Mal/L). When the test media was water environment, only Carbendazim determined inhibition of embryonic development (CI_{50}-96 h de 0.032 mg/L).

In all cases, when the assay environment was reconstituted water, the infective capacity of the larvae that were able to hatch from exposed eggs and of

exposed larvae was significantly affected with respect to their controls since the lowest concentration used. In the case of pesticides, this effect was detectable at concentrations that could be waited in the environment. It was possible to determine that Carbendazim is the most toxic contaminant for embryos and larvae. When considering the effect of the environment on the sensitivity of *C. nobilii* to pesticides, it was determined that the effect depend on the pesticide and not the assay environment.

From the results obtained during experimental period, it was possible to conclude that preparasitic stages of *C. nobilii* have proved to be sensitive to the 7 evaluated toxics in the conditions designed for carrying out the bioassays. Being this so, the protocols designed for such end could be carried out and were repeatable and reliable and have, subsequently, been validated for the ecotoxicological evaluation of Gordiida species.

C. nobilii presents much of the necessary characteristics for being considered a bioindicator species. Until now, it has been proved that the studied species has a wide range of termic tolerance and have been carried out successful offspring in laboratory for other species of the class Gordiida. Also, are conducting research about ecology of varied species, both in the northern hemisphere as in Argentina

The result obtained in this Thesis, are in addition to ecological value (that link terrestrial and aquatic ecosystems, and occupy different levels in the trofic web), reinforcing the attitude of consider to this specie useful in execution of ecotoxicological tests.

Finally, is considered that this is a valuable contribution to regional ecotoxicology, mainly, because tackle the use of a native and parasite specie. Researchs with other approach, as is the case of this Thesis, can be useful for execute ecotoxicological test that cover a higher spectrum inside of environment, making possible perfect the predictive models and collaborate with the creation of laws for protection the environment and their inhabitants.

SECCIÓN I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I
SOBRE LA ESPECIE DE ESTUDIO: *Chordodes nobilii*

El Phylum Nematomorpha junto con Nematoda, Kinorhyncha, Priapulida y Loricifera, conforman un taxón monofilético denominado Nemathelminthes. La totalidad de las especies del phylum son parásitas, y se agrupan en dos clases, Gordiida y Nectonematida. La clase Gordiida, a la que pertenece *Chordodes nobilii*, tiene una amplia distribución mundial, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales, agrupando a 18 géneros. Los estadios de vida libre de esta clase viven en ambientes dulceacuícolas. De la clase Nectonematida se conoce solo un género, con cuatro especies que se encuentran en ambientes marinos (Lorenzen 1985, 1996; Nielsen 2001; Schmidt-Rhaesa 1999, 2001a).

Considerando que los nematomorfos son parásitos, el desarrollo de conceptos y definiciones sobre parasitismo necesarios para comprender características de la especie de estudio se realiza en el Apéndice I (página 129).

El ciclo de vida de los Gordiida presenta 3 fases, preparasitaria de vida libre; parasitaria, y postparasitaria también de vida libre.

ALGUNAS CONSIDERACIONES BIOLÓGICAS SOBRE LOS ESTADIOS DE VIDA DE GORDIIDA

EMBRIONES

El conocimiento sobre el desarrollo embrionario de los gordiidos, ha sido estudiado con pocos detalles en tres especies: *Gordius aquaticus* (Villot, 1874), *Paragordius varius* (Montgomery, 1904; Zanca, 2003) y *Chordodes japonensis* (Inoue, 1958), existiendo muchas controversias, en especial en lo referente a la duración, al tipo de clivaje, a los procesos en la formación de la gástrula (invaginación o ingresión) y a la posición del blastoporo. En cuanto a *Chordodes nobilii* (Figura 1.1.1, página 2), hasta el presente no se registran estudios sobre el desarrollo embrionario.

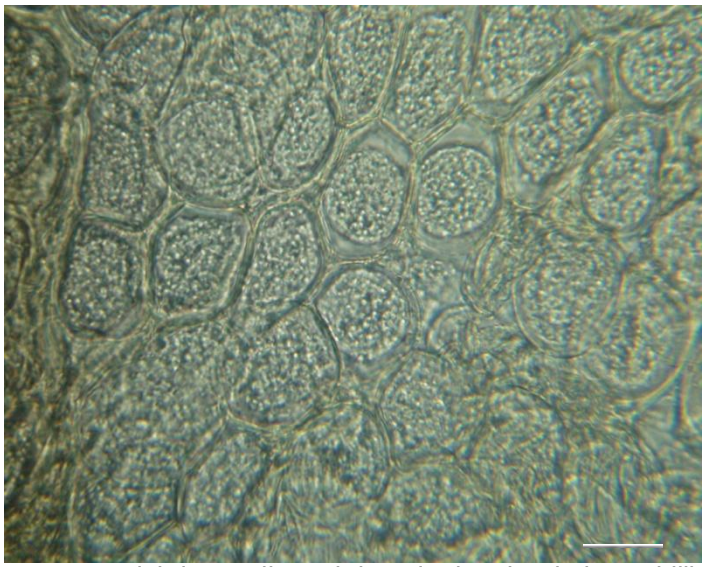

Figura 1.1.1. Etapa temprana del desarrollo embrionario de *Chordodes nobilii*. La barra de escala es igual a 15 µm

LARVAS

Las larvas al eclosionar son completamente diferentes al adulto (Figura 1.1.2). Son muy pequeñas no superando las 100 µm y presentan el cuerpo dividido por un septo en dos regiones, la anterior o preseptal y la posterior o postseptal. Todo el cuerpo larval presenta anillaciones superficiales. El preseptum lleva tres anillos de espinas y ganchos, una probóscis retráctil y tres estiletes. En la región postseptal se encuentra el pseudointestino que probablemente también cumpla funciones glandulares y que desemboca en un poro subterminal. El conjunto de ganchos, estiletes y espinas son utilizados por la larva para ingresar al hospedador y para atravesar las paredes intestinales y llegar al hemocele (Schmidt-Rhaesa, 1999; Zapotosky, 1974, 1975).

Figura 1.1.2. Se observan larvas cercanas a la eclosión, cubiertas por el corion, larva en huevo (LH) y Larvas libres (LL). La barra de escala es igual a 15 µm.

JUVENILES

Su cutícula es muy fina y esta conformada externamente por un material fibrilar semejante al glicocalix seguida por una capa apical homogénea que en su base es fibrilar. Las fibras no están divididas en capas. Esta cutícula extremadamente fina, permite el ingreso de nutrientes desde la cavidad corporal de su hospedador. Antes de abandonar al hospedador la cutícula se muda una vez. La epidermis es unicelular. (Schmidt-Rhaesa, 1997)

ADULTOS

Es la etapa más estudiada del grupo, ya que la diagnosis de las especies se basa hasta el momento en las características morfológicas de los adultos, principalmente de la cutícula.

Los adultos son vermes de cuerpo alargado y cilíndrico (Figura 1.1.3, página 4), con longitudes que van desde unos pocos centímetros hasta un metro y con un diámetro de entre 0,3 a 2 milímetros. Con respecto a *Chordodes nobilii* en particular la bibliografía plantea que la longitud varía entre 82 y 386 mm en las hembras, y entre 82 y 255 mm en los machos, en tanto que el diámetro varía entre 0.9 y 1.5 en hembras y entre 0.6 a 1.1 mm (Miralles, 1989; de Villalobos y col., 2005).

El extremo anterior, en el que se encuentra la abertura bucal, puede ser redondeado o afinado, generalmente con una zona apical de color blanca o amarillenta más clara que el resto del cuerpo, a la que se denomina calota. Por detrás de ella suele haber un anillo oscuro, casi negro. El extremo posterior presenta características claras que permiten distinguir a los machos de las hembras. En las hembras la cloaca siempre tiene una posición central y terminal, mientras que en los machos la cloaca es subterminal y ventral. En los machos de muchos géneros argentinos (*Beatogordius, Gordius, Gordionus* y *Paragordius*) la región posterior a la abertura cloacal está dividida en dos lóbulos. Los lóbulos pueden ser cortos y gruesos o ser largos y afinados. En otros géneros (*Chordodes, Neochordodes, Noteochordodes* y *Pseudochordodes*) los machos presentan el extremo posterior redondeado, entero, en el que puede a veces, observarse un surco medio ventral. En los machos, en el extremo posterior suelen presentarse diferentes estructuras cuticulares tales como espinas que son cónicas cortas y sólidas y cerdas más alargadas y finas. El extremo posterior de las hembras es entero, generalmente dilatado en la región distal. En Argentina solamente las hembras del género *Paragordius* presentan lóbulos terminales.

Figura 1.1.3. Adultos de Gordiida.

El cuerpo de todos los adultos de Gordiida está cubierto con una cutícula rígida y gruesa, secretada por las células epidérmicas. La cutícula presenta numerosas capas de grandes fibras proteicas (de Villalobos y Restelli, 2001, Protasoni y col., 2003). Desde el punto de vista fisiológico, para Inoue (1959), Kirjanova (1959) y Rajaram y Rajulu (1975) intervendría en la absorción de nutrientes mientras que para Hyman (1951), sería sensible a los estímulos químicos y táctiles, o según Zapotovsky (1971) y Schmidt-Rhaesa (1997) podría tener función secretora.

Por debajo de la cutícula se encuentra la epidermis apoyada sobre una fina membrana basal. La musculatura está formada por fibras longitudinales dispuestas helicoidalmente.

Si bien los adultos no se alimentan, poseen un sistema digestivo completo. La boca puede permanecer abierta como en *Paragordius varius* o estar obturada por la cutícula como en *Chordodes nobilii*. La faringe tiene forma tubular y no es funcional debido a que su lumen se encuentra totalmente cuticularizado. El intestino es un largo tubo ventral que corre longitudinalmente a lo largo de todo el cuerpo desembocando en el extremo posterior, junto con el sistema reproductor, en la cloaca y se encuentra rodeado por una cavidad perintestinal (Schmidt-Rhaesa, 1997).

El hecho de que los adultos presentan el sistema digestivo obturado a nivel de la faringe, es decir, que son incapaces de ingerir alimento, plantea otra cuestión a resolver. Reutter (1972) presume que los adultos utilizan los nutrientes almacenados en el tejido parenquimático que fueron incorporados durante la fase parasitaria desde el hospedador. Por otro lado, Inoue (1959), Kirjanova (1959) y Rajaram y Rajulu (1975),

consideran que en los adultos los nutrientes pueden ingresar, desde el medio acuático, a través de la cutícula por un proceso de difusión.

Todas las especies de Gordiida son gonocóricas donde los machos y las hembras muestran un claro dimorfismo sexual en su apariencia externa. Las gónadas en ambos sexos forman dos bandas dorso laterales sólidas que corren a lo largo de todo el cuerpo. Las gónadas están limitadas por células epiteliales que rodean a las gametas y externamente están rodeadas por parénquima. Los ovarios se continúan con los oviductos que desembocan en un atrio glandular que se comunica directamente con un receptáculo seminal. El atrio glandular desemboca en la cloaca de posición terminal conjuntamente con el intestino. Los testículos son voluminosos con gran cantidad de espermatozoides en su interior. La cavidad corporal o pseudocele progresivamente se reduce debido al desarrollo gonadal (de Villalobos y col., 2005).

En cuanto al género *Chordodes* en particular, la diagnosis del mismo determina que su coloración varía de marrón claro a oscuro casi negro. El surco longitudinal ventral es bien evidente aunque poco profundo. El extremo anterior es afinado hacia el ápice. La boca es terminal o subterminal. No se observa un anillo negro que limite la calota. El extremo posterior de los machos es entero. La abertura cloacal es ovalada, subterminal y rodeada por estructuras espiniformes, denominadas espinas circumcloacales. A los lados de la cloaca se presentan dos áreas de tubérculos. El extremo posterior de las hembras es entero, dilatado y con la cloaca ubicada terminalmente. La cutícula posee dos o más tipos areolares, algunas bajas e irregulares, otras papilares y otras, típicas de éste género, que son altas y con penachos o coronas de filamentos largos y finos en su ápice, llamadas areolas coronadas. El surco interareolar es estrecho y con procesos espiniformes.

CICLO BIOLÓGICO

El ciclo de vida de los gordiidos es sumamente complejo ya que involucra dos ambientes, el acuático y el terrestre.

En distintos cuerpos de agua (ríos, arroyos, canales de riego, lagunas, natatorios, tanques de agua domiciliario, etc.) se suelen encontrar adultos entrelazados a la vegetación periférica, entre las rocas, nadando libremente, enrollados con ramas, palos y vegetación en el fondo, o agrupados formando nudos. Desde la primavera los adultos se reúnen para copular, enrollándose entre sí y formando un paquete cerrado casi imposible de separar (Figura 1.1.4, página 8), al que se denomina “nudo gordiano” (Camerano,

1897). Los machos depositan directamente el esperma sobre la zona cloacal de la hembra.

Una vez que el esperma ingresa, se produce la fecundación y los huevos, en la zona del atrio glandular, son cubiertos por una sustancia mucosa y depositados en forma de cordones de aspecto diverso (irregulares y anchos, largos y angostos, etc), dependiendo de las especies (Hanelt y col., 2005). Los cordones de huevos quedan adheridos a las piedras del fondo o a la vegetación tanto flotante como la arraigada en las márgenes de los cuerpos de agua. La estrategia de oviposición es también diferente según las especies. Las hembras del género *Chordodes* depositan los huevos en ristras con forma de zig-zag, en ramas pequeñas, aunque también es común observar a las hembras realizando la oviposición sobre rocas, pero siempre asociados al fondo. Es evidente que estas estrategias en la elección de los lugares de puesta están estrechamente relacionadas con la presencia de los posibles hospedadores.

Las larvas al eclosionar tienen poca movilidad y suelen mantenerse cerca de los cordones de huevos, y luego de aproximadamente una semana, disminuyen su capacidad infectiva. Estas infectan hospedadores acuáticos o que viven a lo largo de la orilla del cuerpo de agua. Los escarabajos, cucarachas, grillos, saltamontes, ciempiés, milpiés y las sanguijuelas son hospedadores comunes de los gordiidos.

Se han propuesto tres estrategias posibles por medio de las cuales las larvas infectan al hospedador: 1) pueden ser ingeridas directamente por un hospedador definitivo (artrópodos terrestres); 2) pueden formar quistes en el medio ambiente y ser accidentalmente ingeridas con la vegetación o con el agua, ó, 3) pueden ingresar y enquistarse en el interior de un hospedador paraténico el cual puede ser capturado por un hospedador definitivo (ver Apéndice I, 129).

Aunque la infección directa de las larvas en un hospedador definitivo ha sido considerada como posible (Inoue, 1962), es poco probable que muchos insectos terrestres puedan tener contacto directo con las larvas acuáticas. Es más factible que los hospedadores paraténicos con larvas de gordiidos en su interior, sean los responsable de que los parásitos puedan “cruzar el puente” entre el ambiente acuático de vida libre y el ambiente terrestre parasitario (de Villalobos y Ronderos, 2003; Hanelt y Janovy, 2003; Schmidt-Rhaesa, 2001).

Con respecto al segundo mecanismo, si bien Dorier (1930) reportó que las larvas en el agua podían enquistarse, este fenómeno no pudo ser observado en ningún estudio posterior (Zanca y col., 2007).

Actualmente, el tercer mecanismo de transmisión larval es el que tiene mayor soporte. Los hospedadores paraténicos pueden ser invertebrados (moluscos, crustáceos, anélidos, larvas de dípteros, larvas de odonatos) y vertebrados (peces y

anfibios) acuáticos (de Villalobos y col., 2003a; Hanelt y col., 2005; Sawyre, 1971; Schmidt-Rhaesa, 2001).

En el hospedador definitivo la larva se aloja en el hemocele y comienza a sufrir modificaciones para transformarse en juvenil. El crecimiento se evidencia principalmente en el aumento en longitud del preseptum, a su vez tanto sus espinas como estiletes desaparecen, siendo difícil establecer el límite entre las dos regiones larvales, denominándose juvenil a esta etapa del desarrollo.

Los Gordiida al completar su desarrollo parasitario pueden alcanzar grandes tamaños (30 cm a 1 metro) comparados con la talla corporal de sus hospedadores, encontrándoselos usualmente en la región abdominal arrollados al intestino, pero pueden llegar a extenderse hacia el tórax o aún a la cabeza. Entre el hospedador y el parásito se establece una gran competencia por el alimento. Estos parásitos además de provocar un colapso intestinal, impiden el desarrollo de los cuerpos grasos y la maduración gonadal, llevando a sus hospedadores a una castración irreversible, e incluso muchos de los hospedadores mueren en forma inmediata después de que los parásitos emergen (de Villalobos y Miralles, 1997; de Villalobos, 1999; de Villalobos y col., 1999; de Villalobos y Zanca, 2001; de Villalobos y col., 2004; Hanelt y Janovy, 2003; Schmidt-Rhaesa, 1997).
Teniendo en cuenta que la mayoría de los hospedadores definitivos son artrópodos terrestres, especialmente los insectos, los gordiidos tienen que afrontar un gran desafío para retornar al agua. Uno de los aspectos más fascinantes de la ecología de los gordiidos es, sin ninguna duda, tratar de explicar cómo estos vermes solucionaron este problema. Se mencionan tres hipótesis para explicar los factores que condicionan a un hospedador terrestre a acercarse al agua y permitir que el adulto emerja e ingrese al cuerpo de agua: 1) la “hipótesis de estímulo” que propone que el parásito produce una sed extrema, que obliga al insecto a acercarse al agua (de Villalobos, 1999); 2) “hipótesis de cambio” que argumenta que los hospedadores se acercan al agua en forma puramente accidental (Spiridonov, 1989) y 3) la “hipótesis del suicidio” donde se analiza que los gordiidos manipulan el comportamiento del hospedador, produciéndole una alteración bioquímica a nivel cerebral, que los desorientan espacialmente y los obligan a acercarse o tirarse al agua (Thomas y col., 2002). Esta última hipótesis es actualmente la más aceptada.

Otro punto para considerar sobre el ciclo de vida de este grupo, es que los distintos estadios ocupan posiciones diferentes en la cadena trófica. En tanto que los juveniles son parásitos, los estadios de vida libre pueden ser predados por diferentes organismos (Cochran y col., 1999; de Villalobos y col., 2008; Kinziger y col., 2002).

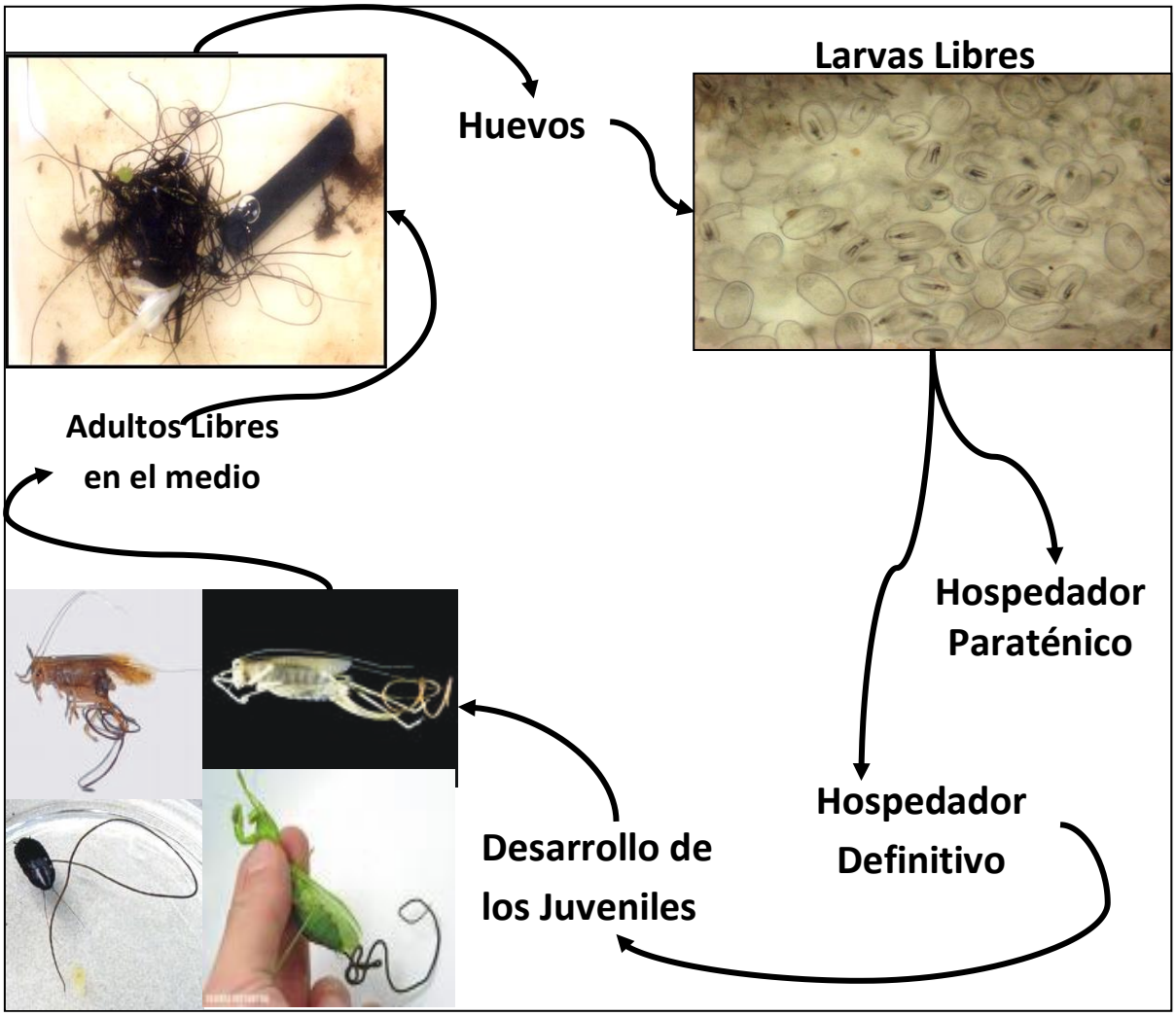

Figura 1.1.4. Esquema del ciclo de vida de los Gordiida.

RESEÑA HISTÓRICA Y ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO DE LOS GORDIIDA

El conocimiento de los Nematomorpha toma importancia durante el final del siglo XIX con los trabajos de Camerano (1894,1915), Linstow (1883,1892) y Villot (1874,1891).

A partir de 1982 se incorporaron estudios ultraestructurales que aportaron nuevos datos sobre la morfología externa e interna de los Gordiida. En nuestro país los trabajos de, Miralles (1984, 1989), de Villalobos (1995, 1999), de Villalobos y Miralles, 1997; de Villalobos y Camino (1999), de Villalobos y col., (1999, 2000, 2003b, 2004, 2005a, 2005b), de Villalobos y Voglino (2000), de Villalobos y Zanca (2001, 2005), Miralles y Camino, 1983; Miralles, 1984; Miralles y de Villalobos (1993, 1996 a,b) Miralles y col., 1997; y de Schmidt-Rhaesa y de Villalobos (2002), permitieron, a través de la utilización

de la microscopía electrónica de barrido (MEB), resolver muchos de los problemas taxonómicos existentes.

El conocimiento de la anatomía interna se acrecentó en gran medida con el uso del microscopio electrónico de transmisión (MET) que permitió conocer la ultraestructura de: 1) la cutícula en algunas especies de Gordiida ; 2) la epidermis; 3) la musculatura; 4) el sistema nervioso en *Gordius aquaticus* y en *Pseudochordodes bedriagae*; 5) el epitelio testicular en *Gordius aquaticus* y *Pseudochordodes bedriagae*; 6) la morfología de los espermatozoides de *Gordius panitighettensis*; *Gordius aquaticus* y *P. bedriagae*; y la ultraestructura del tejido parenquimático y del epitelio intestinal en *Gordius* sp. (de Villalobos y Restelli, 2001; de Villalobos y col., 2005a; Schmidt-Rhaesa, 1996; Schmidt-Rhaesa, 1997b; Schmidt-Rhaesa, 1998b; Restelli y col., 2002).

Son escasos los estudios de carácter fisiológico, solamente se cuenta con información, sobre la relación entre el desarrollo embrionario y la supervivencia de los gordiida con la temperatura, destacándose los trabajos realizados por Baer (1951), Cappucci (1976), Dorier, (1925, 1930), Whittaker y Barrer (1983), Zanca y col. (2007) y sobre el efecto de la humedad de Dorier (1930) en los estadios de vida libre.

A pesar de que la información sobre la relación parásito-hospedador en los Gordiida es escasa y fragmentaria, estudios realizados por Cappuci, 1976; Hanelt y Janovy, 1999, 2003; de Villalobos y Ronderos, 2003; Schmidt-Rhaesa, 2001, 2002; entre otros, destacan la importancia de estos parásitos como posibles biocontroladores tanto de insectos plagas de la agricultura como de los que inciden en la salud humana. En las Tablas 1.1.1 a 1.1.3 se listan hospedadores de gordiidos. En la tabla 1.1.1 se detallan las especies de gordiidos encontrados en distintos hospedadores, a partir de observaciones en campo, en la tabla 1.1.2 se listan las especies de gordidos con las que se realizaron infecciones experimentales. En tanto que en la tabla 1.1.3 se listan hospedadores colectados en campo en los que se encontraron larvas de gordiidos indeterminados.

Tabla 1.1.1. Especies de gordiidos encontrados en hospedadores colectados en campo.

Especie de Gordiida	***Hospedador***	***Referencia***
Gordius aquaticus	*Lymnaea vulgaris* y *L. ovata* (Mollusca)	Chitwood y Chitwood, 1937
Paragordius tricuspidata	*L. ovata* (Mollusca)	Chitwood y Chitwood, 1937
Paragordius varius	larva de Monostoma Redia (Trematoda Digenea)	Hanelt, 2009
Gordius aquaticus	*Lampetra planeri* y *L. fluviatilis* (Petromyzontidae)	Malmqvist y Moravec, 1978
Gordius villoti	larvas de Trichoptera	Valvassori y col., 1988

Tabla 1.1.2. Infecciones experimentales exitosas.

	Infecciones experimentales	
***Especie* de Gordiida**	***Hospedador***	***Referencia***
Parachordodes tolosanus	Renacuajos de *Rana temporaria* y *Bufo* sp.	Blunck, 1924
Gordius aquaticus	renacuajos de *Rana temporaria* y *Bufo* sp	Blunck, 1924
Gordius robustus	larvas de *Aedes aegypti* (Diptera)	Cappucci, 1976
Gordius robustus	larvas de *Aedes sierrensis* (Díptera)	Cappucci, 1976
Gordius robustus	larvas de *Culex pipiens* (Diptera)	Cappucci, 1976
Gordius robustus	larvas de *Culex tarsalis* (Díptera)	Cappucci, 1976
Paragordius varius	*Physella cubensis* (Mollusca)	de Villalobos y col., 2003
Paragordius varius	*Jenynsia multidentata* (Osteictio)	de Villalobos y col., 2003
Paragordius varius	*Dasyhelea necrophila* (Díptera)	de Villalobos y Ronderos, 2003
Chordodes nobilii	larvas de *Aedes aegypti* (Diptera)	de Villalobos y col., 2006, Zanca y col., 2007
Gordius aquaticus	larvas de *Chironomus,* (Diptera)	Dorier, 1930
Gordius aquaticus	*Cloëon dipterum* (Diptera)	Dorier, 1930
Gordius aquaticus	*Planorbis carinatus* (Mollusca)	Dorier, 1930
Gordius aquaticus	*Physa fontinalis* (Mollusca)	Dorier, 1930
Gordius robustus	*Tenebrio molitor* (Coleoptera)	Hanelt y Janovy, 1999
Paragordius varius	*Physa gyrina* (Mollusca)	Hanelt y Janovy, 2004
Chordodes japonensis	larvas de *Cloëon dipterum* (Ephemeroptera)	Inoue, 1962
Chordodes japonensis	larvas de *Chironomus dorsalis* (Diptera)	Inoue, 1962
Chordodes japonensis	larvas de *Culex* (Díptera)	Inoue, 1962
Parachordodes tolosanus	larvas de Ephemeroptera y *Chironomus*,	Von Linstow, 1883
Paragordius tricuspidatus	larvas de Ephemeroptera y *Chironomus*,	Von Linstow, 1883
Gordius aquaticus	*Limnea ovata* (Mollusca)	Von Linstow, 1883

Tabla 1.1.3. Hospedadores de larvas de Gordiida indeterminadas

Hospedador		***Referencia***
Plathelminthes	*Brachycoelium hospitale* (Trematoda)	Blair 1983; Cort 1915
Annelida	*Tubificides*	Dorier, 1928
	Enchytraeidae	Müller, 1920
	*Eropbdella punctata (*Hirudinea)	Sawyer, 1971
	Hirudinea	Villot, 1874; Leidy, 1878
	*Nephelis (Herpobdella) octoculata (*Hirudinea)	Villot, 1891
	Branchiobdelidae	Woodhead, 1950
Mollusca	*Physa gyrina*	Hanelt y col., 2001
	Lymnaea	Linstow, 1883; Villot, 1874, 1891
	Planorbis	Villot, 1874
Arthropoda	*Tabanus autumnalis* (Díptera)	Andreeva, 1978
	Plusiocampa puketti (Diplura)	Bareth, 1974a,b
	Campodea pretneri (Diplura)	Bareth, 1974a,b
Vertebrados	Tejido de peces *Gobiomorphus breviceps* (Vertebrata)	Blair, 1983
	Tejido de peces *Galaxias vulgaris* (Vertebrata)	Blair, 1983
	Anuro, en mesenterio (Vertebrata)	Leidig, 1853

CAPÍTULO II
MARCO CONCEPTUAL:
EL AGUA, LA CONTAMINACIÓN Y LA ECOTOXICOLOGÍA

El uso del agua es más crítico que el de la energía.
Disponemos de fuentes alternas de energía.
Pero con el agua no hay otra elección.
Eugene Odum

El agua ocupa el 71% de la superficie de la Tierra, cumpliendo una serie de funciones importantes para mantener el equilibrio en el planeta, ya que permite mantener el clima, diluye los contaminantes y es esencial para toda forma de vida. A su vez, es una de las bases de la vida, ya que constituye una proporción importante de la estructura de todos los organismos, es el medio donde se realizan la mayoría de las reacciones bioquímicas y es el hábitat para la mayoría de los seres vivos.

El agua, como ambiente, es altamente compleja y diversa. Incluye distintos tipos de ecosistemas (arroyos, lagos, lagunas, ríos, estuarios, y mares), cada uno conformado por componentes, bióticos y abióticos, variados que se conjugan en innumerables combinaciones. Por tanto, cada ecosistema acuático es el producto de las interacciones complejas y dinámicas entre sus componentes que determinan características, constantes y cambiantes en tiempo y espacio (Mason, 1996; Rand y col., 1995).

La gran importancia del agua se debe a la cantidad de propiedades únicas del agua líquida en relación con otras moléculas de peso molecular semejante. Una de ellas concierne al tema de estudio de esta tesis y es la de *solvente*. El agua es capaz de disolver grandes cantidades de una gran variedad de compuestos, por lo cual se la denomina el disolvente universal. Esta propiedad tiene gran importancia ecológica, ya que le permite al agua remover y diluir diferentes sustancias, entre ellas aquellas de origen antrópico. El agua contiene minerales disueltos provenientes de la corteza terrestre, gases atmosféricos y diversos compuestos químicos, orgánicos e inorgánicos. Una porción de los compuestos orgánicos en los sistemas dulceacuícolas es producida por los organismos autotróficos, y otra parte puede provenir desde los ecosistemas terrestres linderos (Dickson, 1994; Rand y col., 1995; Tyller Miller, 1994; Seoánez Calvo, 1996).

Se puede afirmar que actualmente el agua dulce es el recurso natural en mayor riesgo tanto por su escasez como por su calidad. Además de su función primordial como

hábitat para los organismos dulceacuícolas y sustento para la biota en general, el hombre ha encontrado una amplia variedad de aplicaciones para los cuerpos de agua, entre las que se pueden mencionar el abastecimiento público de agua para consumo, riego, actividades industriales, recreación, etc., transformándola en uno de los recursos más importantes para los seres humanos, recurso por el que compiten con el resto de la biota. Para cada uno de los usos mencionados anteriormente es evidente que se requieren distintos grados de calidad del agua. El término *calidad del agua* se refiere a las características físico químicas de un sistema hídrico dado en relación al efecto producido por procesos naturales y actividades humanas. Para que un sistema acuático pueda utilizarse en una o más de las aplicaciones mencionadas anteriormente, la calidad del agua debe respetar los aspectos biológicos (considerar el carácter esencial del agua para los seres vivos), ecológicos (considerar la supervivencia de la biota acuática y la protección de su diversidad) y/o sanitarios (considerar la protección de la salud y la calidad de vida de la población humana) (Dickson, 1994; Rand y col., 1995; Tyller Miller, 1994; Seoánez Calvo, 1996).

En muchas partes del mundo el agua existe en grandes cantidades, y aún hoy con demasiada frecuencia, un buen abastecimiento de agua se da como algo por sentado, y no se considera la posibilidad de que ésta pueda agotarse. Pero, el aumento poblacional, la contaminación de las industrias, el uso excesivo de agroquímicos, la falta de tratamiento de aguas negras y la erosión de suelos por la deforestación, amenazan tales abastecimientos. Estos hechos pueden generar la sobrecarga de los sistemas acuáticos con diferentes sustancias, contaminándose con mayor facilidad ya que la capacidad de actuar como disolvente no alcanza a cumplir con su función de remoción. Si el agua no se trata en forma adecuada su calidad puede degradarse de tal manera que será muy costoso purificarla. Por tanto, la calidad de las aguas es objeto de constante preocupación desde dos puntos de vista a) salud pública y calidad de vida, y b) salud de los ecosistemas acuáticos (Dickson, 1994; Natale, 2006; Tyler Miller, 1994; Seoánez Calvo, 1996).

La contaminación de las aguas es un tema de creciente preocupación mundial, sobre el que existen distintos enfoques, diversidad de definiciones, clasificaciones y posturas, con una visión antropogénica en mayor o menor sentido, en las cuales el enfoque se ha vuelto más holístico.

Para Rand y col., (1995) la polución se refiere a la introducción de sustancias o energía dentro de los ambientes acuáticos, por actividades antrópicas, directa o

indirectamente, resultando en efectos deletéreos como, daños para los recursos vivos, peligro para la salud humana, obstáculo para las actividades acuáticas incluyendo la pesca, el deterioro de la calidad de uso de agua, y la reducción de servicios.

Las sustancias que ingresan en el ambiente generando efectos nocivos reciben distintos nombres, se las denomina, contaminantes, tóxicos, poluentes, estresores, xenobióticos. Para algunos autores estas palabras se pueden aplicar indistintamente, en tanto que para otros cada una corresponde a un tipo particular de sustancia.

Una de las definiciones más abarcativas es la dada por Rand y col., (1995), para quienes el término *poluente* o *tóxico* indica una sustancia que puede producir una respuesta (efecto) adversa en un sistema biológico, dañando seriamente su estructura o función o produciendo la muerte. La respuesta adversa puede ser definida en términos de una medición que está fuera del rango “normal” para la salud de los organismos.

En esta tesis se considerará indistintamente las palabras, contaminante, tóxico y poluente.

Se puede hablar de dos causas de contaminación principales: naturales o antropogénicas. Las *causas naturales* están relacionadas con la composición de suelos y aguas, componentes de algunos alimentos, emanaciones volcánicas, erosión, etc. Las *causas antropogénicas* de la contaminación son: actividades productivas (explotación de recursos renovables y no renovables, la agricultura y la industria); actividades no productivas (transporte, actividades domésticas, servicios); procesos sociales y culturales (urbanización, crecimiento demográfico, economía de consumo). Las fuentes de la contaminación se pueden clasificar en fuentes puntuales y fuentes no puntuales (o difusas). Las *fuentes no puntuales* son extensiones de tierra grandes o dispersas como campos de cultivo, calles y predios que emiten contaminantes al ambiente en un área amplia, incluyen, escorrentía agrícola, escorrentía urbana y emisiones procedentes de vehículos. Una *fuente puntual*, es una fuente individual identificable que descarga contaminantes al ambiente. Dentro de las fuentes puntuales se incluyen las fábricas y las instalaciones industriales y comerciales que vierten sustancias tóxicas en el agua, siendo ejemplos específicos, la chimenea de una planta de energía o industrial, el desagüe de una procesadora de carnes, la chimenea de una casa o el escape de un automóvil. Las fuentes puntuales pueden caracterizarse porque la cantidad y localización de la descarga puede ser medida con mayor precisión que en el caso de las fuentes no puntuales, que cubren grandes áreas o están compuestas de muchas fuentes puntuales. En la actualidad el problema más serio procede de las fuentes no puntuales (Dickson, 1994; Ferrari, 2006;

Forbes y Forbes, 1994; Rand y col., 1995; Seoánez Calvo, 1996; Spiro y Stigliani, 2004; Tyler Miller, 1994).

Los tóxicos pueden clasificarse de acuerdo a su origen en naturales y artificiales o xenobióticos, ejemplos de los segundos son los clorofluorcarbonados, detergentes, plaguicidas, entre otros. Los diferentes contaminantes también pueden agruparse en tres Tipos: 1) Biológicos (virus, bacterias, protozoos, hongos, vegetales o sus metabolitos); 2) Físicos (calor, radiaciones ionizantes o no ionizantes, campos magnéticos; 3) Químicos (gases, hidrocarburos, metales, no metales, pesticidas, plásticos) (Ferrari, 2006).

Sin importar el enfoque disciplinar que se utilice hoy en día la importancia tanto de la cantidad como de la calidad del agua está fuera de toda duda. Para evitar las consecuencias del uso de agua contaminada se han ideado mecanismos de detección, control y gestión de la contaminación. En general, los esfuerzos se centraron en un principio en la cuantificación de parámetros fisicoquímicos (carga orgánica, temperatura del agua, pH, OD, COD, concentraciones de metales pesados, etc.), permitiendo obtener un valor específico para cada parámetro, pero la interpretación de esta información es difícil, ya que analizar todos los componentes del agua implica mucho tiempo y eleva los costos de la evaluación; además estas evaluaciones no tienen en cuenta el efecto que los contaminantes pueden tener sobre los organismos, ni otros impactos ecológicos.

Dentro de este marco se ha desarrollado la ecotoxicología, una rama de la ciencia que combina principalmente los campos de la ecología y la toxicología. La definición original de la ecotoxicología como “la rama de la Toxicología concerniente con el estudio de los efectos tóxicos, causados por poluentes (naturales o sintéticos) a los constituyentes de los ecosistemas, animales (incluyendo a los humanos), vegetales y microbios, en un contexto integral” se atribuye a Truhaut (1977). Desde ese momento la ecotoxicología fue redefinida en varias oportunidades. Según Butler (1984), la ecotoxicología es “el estudio de los efectos de los poluentes liberados en el ambiente sobre este y sobre los organismos que lo habitan”. Moriarty (1988), más adelante la definió como el estudio del efecto de los poluentes sobre los ecosistemas. Para Levin y col., (1989), es la ciencia que se propone predecir el impacto de los agentes químicos sobre los ecosistemas. Es el estudio del destino y efecto de los agentes tóxicos sobre los ecosistemas, para Cairns y Mount (1990). También fue definida como el estudio causado por agentes químicos en el ecosistema (Walker y col., 2001). Forbes y Forbes (1994), la definen como el campo de estudio que integra los efectos ecológicos y toxicológicos de químicos sobre poblaciones,

comunidades y ecosistemas, con el destino (transporte, transformación y descomposición) de tales químicos en el ambiente. Finalmente podemos mencionar a Newman (2001), quien definió a la ecotoxicología como la ciencia de los contaminantes en la biosfera y sus efectos sobre los constituyentes de la biosfera, incluidos los humanos (Ferrari, 2006; Forbes y Forbes, 1994; Moriarty, 1988; Newman, 2001; Rand y col., 1995).

A partir de lo expuesto anteriormente, se pueden observar diferencias en cuanto a la ubicación de la ecotoxicología dentro de la ciencia, y en cómo se define la misma, pero a pesar de estas diferencias existen dos factores en común: los agentes tóxicos y el ecosistema (Ferrari, 2006).

Al realizar un resumen de distintas definiciones se podría concluir que la ecotoxicología, desde una visión interdisciplinaria y sintética, estudia, describe, analiza y predice el comportamiento de agentes químicos y físicos sobre el medio, y las respuestas generadas por los organismos vivos a partir de los cambios producidos en el ambiente, con particular atención a poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos, considerando que el destino y el efecto de las sustancias en los ecosistemas son componentes inseparables de la función del ecosistema, y evalúa finalmente el riesgo asociado con las emisiones de éstos agentes.

La maduración de la ecotoxicolgía como disciplina está asociada con cambios trascendentes en los enfoques asumidos para estudiar el ecosistema y la relación del hombre con este. Los humanos habitan este planeta desde hace dos millones de años al menos, y como cualquier otra especie interactúan con su ambiente desde su aparición. En la actualidad considerar como ecosistemas naturales a aquellos en los que no se encuentra ningún vestigio de población humana es ilógico, así como considerar a la humanidad solamente como un factor desequilibrante en el ambiente. Los cambios ambientales son el resultado de procesos, consecuencia de múltiples interacciones, que anteceden a la aparición de los seres humanos, y de los cuales, la humanidad a formado parte desde su aparición, adicionando paulatinamente a los procesos naturales los culturales. El porqué de los desequilibrios generados por causas antropogénicas debe buscarse en la relación generada entre la naturaleza, los humanos y la cultura. En este proceso, la función de la ecotoxicología como ciencia, es explicativa.

La ecotoxicología considera a los organismos vivos como herramientas esenciales para la evaluación de la calidad ambiental. Históricamente, la utilización de métodos biológicos para la detección de sustancias nocivas o peligrosas en el ambiente se registra por primera vez a principios del siglo XX. Hacia 1940 se introdujo el uso de bioensayos

con peces y durante los años cincuenta se inician las pruebas con invertebrados y algas. En los años 70 comenzaron a protocolizarse de manera estandarizada el uso de bioensayos para detectar compuestos tóxicos. El concepto de bioensayo deriva de la toxicología clásica y ha sido adaptado y empleado en el campo de la ecotoxicología, donde se utiliza para entender el efecto de los tóxicos sobre los organismos y monitorear el ambiente en situaciones problemáticas (Forbes y Forbes, 1994; Iannacone Oliver y col. 2003; Lafferty, 1997; Ronco y col., 2004; www.cricyt.edu.ar/enciclopedia).

Los bioensayos pueden detectar la toxicidad de un poluente a concentraciones muy bajas, las que son difíciles o aún imposibles de detectar por análisis químicos. La toxicidad puede evaluarse en base a las respuestas de los sistemas biológicos, las más utilizadas son, letalidad, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos e inhibición del desarrollo, aunque también podemos encontrar bioensayos que analizan respuestas como proliferación y multiplicación. Los bioensayos también generan información sobre los efectos antagonistas, sinergistas o aditivos de mezclas complejas, por lo tanto, son utilizados ampliamente para monitorear descargas de efluentes (Espina y Vanegas, 2005; Gagneten, 2002; Gagneten y Marchese, 2003; Rand y col., 1995; Ronco y col., 2004; Jorge y Moreira, 2005).

Los protocolos utilizados en los bioensayos deben estar estandarizados, para poder determinar que la respuesta generada en el grupo expuesto al tóxico se deba al efecto de la sustancia y no a variaciones de la sensibilidad propia de los organismos, y también para poder comparar los resultados entre diferentes laboratorios. Varias organizaciones internacionales (ASTM, 1996; OECD, 1993; ISO, 1996; EC, 1992 y USEPA, 1994), desde hace tiempo han estandarizado las metodologías para la realización de los bioensayos con distintos organismos, basándose la gran mayoría en especies del hemisferio norte. En Latinoamérica existen algunas experiencias de ejercicios de intra e intercalibración empleando baterías de bioensayos, como los desarrollados en Argentina (Ronco y col., 2000), Chile (Castillo & Schäfer, 2000; Castillo y col., 2000a), Colombia (Díaz-Baez & Perez, 2000), Costa Rica (Castillo y col, 2000b), México (Pica y col., 2000), Perú (Iannacone Oliver y col., 2003), para la evaluación de tóxicos de referencias con el fin de determinar el grado de repetibilidad, precisión o variabilidad de estas pruebas ecotoxicológicas (Iannacone Oliver y col. 2003; Rand y col., 1995; Ronco y col., 2004).

Los bioensayos pueden clasificarse considerando diferentes criterios (Ferrari, 2006; Newamn, 2001; Rand y col., 1995; Ronco y col., 2004):

- El medio en el que se realiza: agua, sedimento o suelo
- Su duración: corto, mediano o largo plazo.
- El sistema de exposición: el método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo puede ser estático, con renovación, de flujo continuo.
- El propósito para el cual son utilizados: control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etcétera.

En función de la duración se habla de ensayos agudos y crónicos. Los ensayos agudos comprenden un tiempo de exposición corto (generalmente de 24 a 96 hs), a una serie de concentraciones crecientes del tóxico de un nivel tal que se obtenga respuesta. Entre los efectos medidos (puntos finales) más habituales se encuentra la mortalidad e inmovilidad. Los ensayos de toxicidad crónicos consideran una exposición prolongada a concentraciones subletales. Puede ser una exposición crónica completa (ciclo de vida completo) o crónica parcial que involucra solo una parte del ciclo de vida, generalmente la más sensible.

También se pueden definir ensayos de tipo uniespecíficos y multiespecíficos. En particular los uniespecíficos son generalmente de laboratorio, proveen gran cantidad de información acerca de la concentración interna y externa, la duración de exposición que produce mortalidad, y los efectos subletales. Este tipo de bioensayos cumplen con muchas de las premisas para criterios adecuados, como reproducibilidad, estandarización etc. Su principal limitación es que las condiciones del ensayo no son las mismas que las del medio natural. Su utilidad es función también de la especie prueba seleccionada, además no tienen en cuenta la interacción entre especies que ocurre en el ambiente natural.

Los bioensayos estandarizados con organismos prueba validados tienen por objeto hacer posible la extrapolación de sus resultados al efecto sobre la biota en un ambiente dado, para la identificación de elementos biológicos en riesgo. Pero, se debe tener en cuenta que muchos bioensayos evalúan el efecto de un solo compuesto, sobre una especie solamente, incluso utilizando para el ensayo una etapa del ciclo de vida de la especie prueba, siendo las condiciones bajo las que se realiza el bioensayo condiciones controladas de laboratorio, y por tanto la relevancia ecológica de las conclusiones a las que se arriba es limitada. Se debe considerar que no existe bioensayo que permita evaluar todos los efectos que se pueden dar sobre un ecosistema, pero a pesar de esta desventaja, la realización de estas pruebas puede alertar sobre la presencia de

sustancias y/o situaciones riesgosas para la biocenosis (Persoone, y col., 1990; Lafferty, 1997; Silva y col., 2003; Ronco y col., 2004; Kobayashi y Okamura, 2004; Ferrari y col., 2005; Jorge y Moreira, 2005; Natale, 2006).

Los bioensayos ofrecen un punto de comparación válido, al permitir confrontar la toxicidad relativa de determinadas sustancias químicas puras o sus mezclas, evaluando así el efecto o impacto de los agentes contaminantes sobre los organismos de prueba, teniendo en cuenta diferentes puntos finales, evaluando tanto efectos letales como subletales, que consideran, además de la supervivencia, aspectos vinculados con el normal crecimiento y desarrollo de los organismos de una población (Natale, 2006).

Como se mencionó anteriormente, los bioensayos evalúan el efecto de los poluentes sobre los organismos a partir de diferentes puntos finales. Para lo mismo se debe diseñar y seguir un protocolo de ensayo considerado en este proceso las particularidades de la especie prueba.

En Ronco y col. (2004), se describen los pasos básicos a seguir para el diseño de experimentos: “determinar un número razonable de repeticiones (dependiendo de La prueba), aleatorización de las dosis en las unidades experimentales y un control para lograr una estimación válida del error experimental. En la mayoría de las pruebas se trabaja con un diseño completamente aleatorizado, del tipo clásico, para ser analizado a través del análisis de la varianza o del análisis de regresión, con unidades experimentales homogéneas y condiciones ambientales controladas. Sin embargo, en algunos casos es necesario recurrir a análisis de covarianza o ANOVA en bloques para controlar la heterogeneidad de las unidades experimentales.” Los mismos autores indican que para poder dar cumplimiento a los requerimientos de validez y precisión de las pruebas es necesario utilizar una metodología estadística desde la planificación hasta la ejecución y, luego, el posterior análisis de los resultados. El criterio básico recomendado es seleccionar un método estadístico sencillo, que se ajuste a las condiciones experimentales y que permita obtener resultados válidos. Para el análisis estadístico se debe especificar la respuesta (punto final), ya sea en términos de una frecuencia de conteos, una tasa de mortalidad, una tasa de inhibición, etcétera.”

La elección de los puntos finales (definidos como medida o valor que expresa el resultado de un ensayo) es un tema básico en el diseño de un protocolo de ensayo y requiere tener en especial consideración, las particularidades de la especie, así como los requerimientos en infraestructura necesarios.

Son puntos finales habituales medidas cuantales como la concentración más alta a la cual no se observa efecto (NOEC); la concentración más baja a la que se observa efecto (LOEC); la concentración efectiva (CE) correspondiente a una estimación de la concentración del tóxico que puede causar un efecto adverso observable, mediante una respuesta discreta en un porcentaje dado de organismos; concentración letal (CL), la cual corresponde a la concentración del tóxico o efluente o muestra que causa la muerte a un determinado porcentaje de la población expuesta; y concentración inhibitoria (CI), la cual corresponde a la concentración del tóxico o muestra o efluente que puede producir una reducción de una respuesta biológica en una población expuesta (Ronco y col., 2004).

Una de las mayores ventajas de los bioensayos es que permiten una evaluación de la toxicidad relativamente económica, siendo un elemento de relevancia fundamental el organismo con el cual se trabaja.

La elección de la especie de ensayo dependerá básicamente del objetivo propuesto. Se han planteado una serie de requisitos para que una especie pueda ser considerada como organismo de prueba (Ferrari, 2006; Natale, 2006; Rand y col, 1995), que se mencionan a continuación:

- Conocimiento del grado de dificultad o la facilidad para obtener adultos reproductores. Son preferibles las especies con alta disponibilidad y abundancia.
- Factibilidad y disponibilidad de métodos de reproducción y cría en laboratorio comprobados.
- De mantenimiento sencillo y que no se vean afectadas por el manejo en laboratorio a lo largo del ciclo de vida.
- Conocer su susceptibilidad a enfermedades y parásitos.
- Conocimiento de la sensibilidad a sustancias tóxicas que suelen estar presentes en los vuelcos y a compuestos patrones de referencia ampliamente usados en estudios de toxicología clásica. Son preferibles las especies más sensibles a estas sustancias y aquellas que mantengan una sensibilidad estable en el tiempo.
- Ser representativas de los ecosistemas que pueden recibir el impacto.
- Conocer la relación filogenética y ecológica, con las especies recomendadas por los organismos oficiales (USEPA, ASTM, OECD, UE, IRAM, etc.).
- Considerar la importancia ecológica y económica.
- Conocimiento de los principales aspectos sobre la biología, ecología y fisiología de la especie elegida. Son preferibles aquellas que posean hábitos de vida relacionados con la problemática a evaluar, como así las que se reproduzcan en forma continua y con

elevada fecundidad. También son preferibles las especies que posean ciclos de vida cortos y dimensiones manejables.

- Debido a que la sensibilidad varía entre especies debería seleccionarse un grupo de especies que representen un rango amplio de sensibilidad.

Un gran porcentaje de los estudios realizados utilizan a las denominadas especies modelos, quienes representan funciones ecológicas relevantes. Un punto importante que se critica es que muchas de las especies seleccionadas para la realización de los bioensayos pertenecen al hemisferio norte. A este hecho se le suma que aún en la actualidad la información ecotoxicológica disponible sobre especies neotropicales sigue siendo escasa. Esta situación plantea la necesidad de encontrar especies para el hemisferio sur que sean referentes de sus ambientes. Por tanto se debe continuar y aumentar el estudio sobre especies nativas, determinando cuales son sensibles a tóxicos y cumplen con los requisitos planteados para ser consideradas un buen organismo de prueba; ya que sólo se podrá avanzar en el campo de la ecotoxicología regional a partir de los resultados obtenidos al desarrollar este tipo de líneas de investigación (Ferrari y col., 1997; Demichelis y col., 2001; Ronco y col., 2000a; Natale y col., 2000; de la Torre, 2001; Carriquiriborde y Ronco, 2002; Bulus Rossini y Ronco, 2004; Ronco y col., 2004; Lapinska y col., 2004; Ferrari y col., 2005; Natale, 2006; Salibián, 2006).

CAPÍTULO III
PARÁSITOS:
¿INDICADORES DE POLUCIÓN?

Un área de vacancia en las evaluaciones ecotoxicológicas está representada por el rol de las relaciones interespecíficas en la dinámica de los ecosistemas alterados y en particular el papel del parasitismo. Varias especies parásitas han demostrado ser sensibles a diversos contaminantes (Lafferty, 1997; Mackenzie, 1999; Pietrock y col., 2002a,b; Pietrock y Marcogliese, 2003; Sabo y col., 2009; Sures, 1999; Sures, 2004;). Debido a su posición en el ecosistema, las modificaciones en el ambiente afectan la dinámica poblacional de enfermedades debidas a parasitismo, afectando entonces la composición de las comunidades (Lafferty y Holt, 2003). Por tanto determinar la sensibilidad de este grupo es fundamental para comprender la dinámica de las comunidades.

Mientras muchos parásitos son extremadamente sensibles a los cambios ambientales, otros son más resistentes que sus hospedadores y tienden a incrementar su número en condiciones de polución. Como se observa en la tabla 1.3.1 (página 23) existen variaciones enormes en la respuesta de diferentes taxa de parásitos a distintos tipos de polución. Como una regla general, se ha comprobado que en ambientes contaminados las infecciones con helmintos endoparásitos con ciclos de vida indirectos complejos tienden a disminuir, mientras que las infecciones con ectoparásitos con ciclos de vida directos con un único hospedador tienden a incrementar, cuando los niveles de polución aumentan. Los endoparásitos con ciclos de vida indirectos pueden ser afectados directa o indirectamente por poluentes: directamente a través de los estados de transmisión de vida libre o de las formas adultas en el tracto alimentario que entran en contacto directo con el poluente, o, indirectamente a través de efectos adversos del poluente en otros hospedadores en su ciclo de vida. En el otro extremo, muchos de los ectoparásitos con ciclos de vida directos han demostrado ser más tolerantes que sus hospedadores a ciertos tipos de cambios ambientales, entre ellos los contaminantes. Una explicación a esta diferencia en la sensibilidad entre ecto y endoparásitos es que los primeros han estado en contacto constante con el ambiente externo en el curso de su evolución y desarrollaron una mayor flexibilidad y resistencia a ciertos cambios ambientales que los endoparásitos (Mackenzie, 1999).

El parasitismo como estilo de vida es muy común en el reino animal. El esparcimiento de los parásitos y la colonización exitosa de nuevos hábitats depende de numerosas variables ambientales bióticas y abióticas**.** Por lo tanto la presencia de parásitos en o sobre sus hospedadores indica que se dieron las condiciones necesarias para su desarrollo individual, al menos temporariamente en el hábitat local. Debido a su posición en el ecosistema y a que existen estudios que demuestran su sensibilidad a varios poluentes, se ha planteado su utilización como bioindicadores de calidad ambiental. Sin embargo, si se sugiere que varias especies de parásitos sean consideradas como bioindicadoras, ellas tienen que poder ser clasificadas en las categorías existentes que son aceptables para los ecólogos y ecotoxicólogos (indicadores de efecto, indicadores de acumulación) (Sures, 2004).

Tabla 1.3.1. Efectos de diferentes tipos de contaminación en diferentes taxa de parásitos; tomada de Mackenzie (1999).

Tipo de polución	***Taxa de Parásitos***					
	Ciliophora	Monogenea	Nematoda	Digenea	Cestoda	Acantocephala
Eutrofización		+	+	+	+	+
Efluentes termales	+		+	-		
Efluentes de papeleras	+	-	-	-		
Combustibles	+	+	+	-		-
Efluentes industriales	+		-	-	-	-
Lodos de depuradora					+	-
Precipitación ácida		-		-	-	+
Metales pesados		-		-	-	-

a El signo + indica un incremento en la abundancia de los parásitos, el signo – indica una disminución, y los espacios en blanco indican que no hay datos disponibles.

Un buen indicador biológico para monitorear los efectos de los poluentes sobre los organismos debe ser excepcionalmente resistente o excepcionalmente sensible a los cambios ambientales de modo que los cambios significativos en su número puedan ser usados como una advertencia temprana del deterioro de las condiciones ambientales antes de que la mayoría de los organismos sean afectados seriamente (Mackenzie, 1999). Los organismos que toleran y acumulan toxinas pueden actuar como “especies centinelas”. Las especies centinelas deben ser ubicuas, preferentemente sedentarias y tener una vida larga. Debido a que las especies centinelas son tolerantes, ellas no dan

demasiada información acerca del impacto sobre otras especies en el ambiente. El impacto de un poluente sobre el ambiente se refleja mucho mejor a través de la determinación de la abundancia de las *especies indicadoras* o *bioindicadoras*, organismos conocidos por ser sensibles o estar asociado con un impacto particular (Lafferty, 1997).

Para Espina y Vanegas (2005) la consideración de especies sensibles a los tóxicos ambientales implica que, si éstas existen también deben existir intervalos de sensibilidad y especies tolerantes. Pero, para poder proteger a los organismos es necesario conocer el efecto de los tóxicos sobre las especies más sensibles, especialmente sobre los estadios más susceptibles de su ciclo de vida. Conocer cuales son las especies sensibles permitirá detectar el deterioro de un ecosistema en las primeras etapas del mismo.

Los *bioindicadores de efecto* pueden proveer información valiosa acerca del estado químico de su ambiente a través de cambios en su fisiología y/o comportamiento. Por ejemplo, el comportamiento de apertura de valvas de los bivalvos puede utilizarse en el monitoreo de contaminación en hábitats acuáticos. La indicación de efecto es posible también sobre otros niveles de organización, como los celulares y subcelulares (biomarcadores) y los de supraorganismo a nivel de poblaciones (cambios en la tasa reproductiva de una población dada o, en la composición de la comunidad de un cuerpo de agua determinado). En la tabla 1.3.2 (página 25) se detallan respuestas de los niveles de organización que pueden ser utilizadas como bioindicadoras. Si la polución ambiental se manifiesta sobre el último nivel, análisis más tempranos sobre los niveles celulares y de organismo podrían haber ayudado a evitar efectos severos sobre poblaciones y biocenosis (Sures, 2004).

La aproximación más común en el uso de parásitos como indicadores de contaminación ha sido realizando la comparación de la prevalencia o intensidad de parasitismo entre los hospedadores capturados en un pequeño número de sitios control e impactados, o un único sitio antes y después del impacto, y menos comúnmente cuantificar el parasitismo a diferentes distancias desde una fuente puntual o a lo largo de un gradiente de contaminación (Lafferty, 1997), aunque son muchos los estudios de parásitos que evalúan bioconcentración o bioacumulación de distintas sustancias (Elijah y col., 2010; Sures, 2001, 2003; Sures y col., 1999, 2003; Thielen y col., 2004).

Tabla 1.3.2. Respuestas de los distintos niveles de organización a los cambios en la calidad ambiental.

Tiempo	***Nivel de organización***	***Respuesta***
Meses a siglos	ecosistema	Desestabilización, efectos negativos sobre la sucesión
Meses a siglos	comunidades	Cambios y pérdidas de componentes (estructura y cadena alimentaria)
Meses a años	poblaciones	Cambios en la distribución , densidad, estructura y dinámica
Días a meses	organismos	Salud (comportamiento alterado, acumulación y transformación, mutagénesis), mortalidad
Inmediato a días	suborganismo	Alteraciones bioquímicas y fisiológicas

La identificación de bioindicadores para diagnosticar a los agentes que causan cambios adversos en los sistemas ecológicos es un reto importante en la evaluación de riesgo ambiental. En algunos casos, *especies de interés especial* (tales como especies en peligro de extinción o especies que juegan un rol clave en la organización de una comunidad) son bioindicadores ambientales justificables. Los parásitos de interés médico o veterinario, o aquellos que regulan las poblaciones del hospedador, particularmente de plagas, pueden encontrarse dentro de este grupo. La diversidad de especies (usualmente limitada a la medición de un grupo taxonómico (Ej. peces) o gremios funcionales (Ej. fauna bentónica) da un punto de vista más global de la comunidad en cuestión pero puede ser costoso evaluarla. Desafortunadamente, no siempre es claro como la diversidad puede variar con impactos particulares porque, algunas especies pueden incrementarse mientras otras declinan. La agrupación de varias especies indicadoras para formar *índices bióticos* (ej. Proporción de nematodos respecto de copépodos) provee una reflexión más amplia de los impactos. En nuestro país se han desarrollado distintos índices bióticos para distintas áreas que se basan en macroinvertebrados (Rodriguez Capítulo, 1999; Rodriguez Capítulo y col., 2001; Miserendino y Pizzolón, 2002; Fernandez y col., 2008; Miserendino y col., 2008, García y col, 2008). El uso de los índices bióticos requiere un firme entendimiento de las asociaciones entre las especies indicadoras y el impacto de interés. Considerando que los índices bióticos suelen reflejar solamente un tipo de impacto específico, la aproximación más abarcativa es combinar múltiples mediciones en un solo índice. Un *índice de integridad biológica* puede ser construido a partir de una serie de mediciones de un ensamble (en sistemas dulceacuícolas, estos

ensambles están conformados típicamente por peces, invertebrados y diatomeas) que abarcan la riqueza y composición (distinguiendo entre especies tolerantes e intolerantes), composición trófica (porcentaje de herbívoros, omnívoros y predadores), condición (porcentaje de enfermos, porcentajes de individuos anormales) y abundancia. Para aumentar la efectividad de los estudios debe considerarse la importancia, en el futuro, de incorporar grupos parásitos dentro de los índices de diversidad biológica (Lafferty, 1997; Damásio y col., 2008).

Existen razones de importancia para focalizarse en el estudio de parásitos como indicadores de contaminación (Mackenzie, 1999; Sures, 2004), como las siguientes:

1. Hay más especies parásitas que especies de vida libre en la Tierra y los organismos parásitos muestran una diversidad biológica enorme, reflejando adaptaciones a la forma de vida parásita en diferentes tipos de hospedadores y en diversos sitios y ambientes.

2. En los parásitos metazoos con ciclos de vida complejos los diferentes estados de desarrollo tiene requerimientos biológicos heterogéneos, por consiguiente pueden ser afectados de manera diferencial por los poluentes, de manera que cada estado debe ser evaluado separadamente, incrementando así enormemente el número de indicadores potenciales.

3. Muchos parásitos tienen estados de transmisión de vida libre cortos y delicados que son altamente sensibles a los cambios ambientales. Ellos pueden por lo tanto ser afectados adversamente incluso por cambios menores en el ambiente y así representan eslabones débiles en su ciclo de vida.

Los patrones en las infecciones parasitarias que llevan al cumplimiento exitoso del ciclo de vida parásito y su dinámica poblacional puede verse afectado por, una reducción en la viabilidad de los estados infectivos o de transmisión que puede limitar el periodo de encuentro con un hospedador susceptible, y/o por cambios en abundancia y/o inmunidad de hospedadores intermediarios y finales, debidas o no a problemas ambientales.

Aunque se ha asumido que los parásitos son vulnerables a los tóxicos durante sus fases de vida libre, la evidencia experimental sobre la influencia de los contaminantes sobre la viabilidad de estos estados aún es escasa, comparada con la existente para otros grupos de organismos. Desde mediados de la década de 1980 el resultado de las actividades antrópicas sobre las poblaciones y comunidades de parásitos comenzó a estudiarse con mayor profundidad (Khan y Thulin, 1991; Mackenzie, 1999; Pietrock y col., 2002, Pietrock y Marcogliese, 2003). En el momento en que se inician los estudios de esta

Tesis (año 2004), se puede decir que estaba desarrollándose un importante campo en la investigación interdisciplinaria, la utilización de organismos parásitos en el monitoreo de polución ambiental (Sures, 2004), al que esta tesis pretende aportar con nueva información, acerca de un grupo todavía no explorado a nivel ecotoxicológico al día de hoy a nivel mundial.

CAPÍTULO IV
ANTECEDENTES ECOTOXICOLÓGICOS

No existen estudios previos sobre la evaluación de la sensibilidad de Gordiida a distintos contaminantes, pero hay numerosas investigaciones realizadas sobre otros grupos de invertebrados, que aportan información valiosa. Los resultados obtenidos en ésta Tesis son los primeros acerca del efecto que, sustancias de origen antrópico, puedan ejercer sobre individuos del Phylum Nematomorpha. Durante los años en que se desarrollo éste estudio se generó producción científica, la que se ha dado a conocer en distintas revistas científicas y en diferentes congresos (Ver Apéndice III, página 153)

Para la evaluación ecotoxicológica de ambientes acuáticos, tradicionalmente se utilizan organismos representativos de los diferentes niveles tróficos, tanto de agua, fitoplancton (*Pseudocherqiela subcapitata*) zooplancton (*Daphnia magna*), vertebrados, (*Pimephales promelas*, *Onchorincus michis*, etc), como del sedimento *Hyallea azteca*, *Chironomus riparius, Lumbriculus variegatus*, etc. Entre los vertebrados, los peces ocupan una posición de privilegio entre los organismos elegidos para la realización de bioensayos, seguidos por los anfibios, en tanto que dentro de los invertebrados, los crustáceos es el grupo con más especies evaluadas, seguido por los moluscos y los equinoideos (estos últimos para el hábitat marino) (Bellas y col., 2001; Jorge y Moreira, 2005).

Uno de los primeros trabajos es el realizado por Woelke (1972), quien realizó ensayos de embriogénesis en el bivalvo conocido como ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, para determinar la calidad del agua, generando un criterio para la protección de los recursos marinos. Otro trabajo importante en esta década, citado por un gran número de autores, es el de Folmar y col. (1979), este trabajo es un adelantado a la problemática del glifosato, ya que en éste se evaluó el efecto de este herbicida en 4 especies de peces (*Salmo gairdneri*, *Pimephales promelas*, *Ictalurus punctatus* y *Lepomis macrochirus*), 4 especies de invertebrados, un cladócero (*Daphnia magna*), un anfípodo (*Gammarus pseudolimnaeus*), dos insectos, un díptero (*Chironomus plumosus*) y un efemeróptero (*Ephemerella walkeri*). Desde estas primeras publicaciones hasta hoy día es innumerables la cantidad de trabajos publicados en el área de la ecotoxicología acuática, en especial aquellos tendientes a la normatización de los bioensayos con fines de monitoreo ambiental. Se pueden mencionar entre muchos otros los trabajos de Pagano y

col., (1983) que evaluaron los efectos de Cr, en estado hexavalente y trivalente en la fertilización y el desarrollo de erizos de mar, los estudios de Willuhn y col., (1996) sobre la toxicidad de Cr y Cd en el oligoqueto *Enchytraeus buchholzi*, y de de Calevro y col., (1998), sobre el efecto de tres metales pesados (aluminio, cromo y cadmio) en el poder de regeneración de la planaria *Dugesia etrusca* (Platyhelminthes, Turbellaria). En nuestro país en relación a invertebrados nativos se pueden mencionar entre otros los trabajos de Ferrari y col., (1989) y Hernandez y col., (1990) acerca del efecto de plaguicidas sobre la fertilización y el desarrollo larval de erizos de mar, y Lombardo y col, 1982, 1991 con larvas de *Lithodes centolla*. Para ambientes de agua dulce distintos trabajos muestran los bioensayos realizados con especies autóctonas, como el realizado por Jergentz y col., (2004), en *Hyalella curvispina* y *Macrobrachium borelli*, para evaluar la contaminación agrícola en dos arroyos de la pampa Argentina, más recientemente la tesis de Garcia (2008) con *Hyalella curvispina*, y el de Giusto y Ferrari 2008, con *Hyallella pseudoazteca*, entre otros.

En particular para parásitos, desde 1980 hasta fines de la década del 90 se publicaron aproximadamente entre 130-150 artículos, que están directamente relacionadas con la evaluación de la relación entre polución y parasitismo, principalmente en el ambiente acuático (Sures y col., 1999). En la primera década de este siglo se pueden destacar las investigaciones desarrolladas por Pietrock y col. (2002 a,b) sobre la supervivencia de cercarias de *Diplostomun* (Digenea) a la exposición de metales, el trabajo de Gheorghiu y col. (2007), donde se evaluaron los efectos del Zn sobre reproducción, supervivencia y morfometría del monogeneo *Gyrodactylus turnbulli*, y, los de Sures (2004, 2008) donde se evalúan las interacciones entre poluentes y parásitos en los ambientes acuáticos y la relevancia de estos en el monitoreo de la polución ambiental.

Los Nematoda, grupo hermano de los Nematomorpha, son objeto de estudio ecotoxicológico desde la década del setenta. Entre estos estudios, el trabajo de Popham y Webster (1979) evaluaron el efecto del cadmio en la fecundidad, crecimiento y estructura microscópica de *Caenorhabditis elegans*; también se destaca el realizado por Samoiloff y col. (1980) en el que se testearon quince compuestos cancerígenos o mutagénicos, seis compuestos potencialmente cancerígenos y siete metales pesados sobre *Panagrellus redivivus*; también podemos citar el de Jaworska y col. (1997), quienes analizaron el efecto de 16 iones metálicos sobre la supervivencia y el poder infectivo del entomoparásito *Heterorhabdites bacteriophora*; el de Jaworska y Tomasik (1999), quienes estudiaron los efectos de ocho iones metálicos sobre la mortalidad, el efecto patogénico y

la productividad, en los nematodes entomopatogénicos *Steinernema carpocapsae y Heterorhabdites bacteriophora*, bajo condiciones de laboratorio.

Varios trabajos utilizan a la ya especie modelo *Caenorhabditis elegans*, para analizar el efecto de distintos tóxicos, entre estos el de Wang, y col. (2007), que evalúan toxicidad por Zn y las propiedades de transferencia de esta especie a su progenie, el de Wang y Xing (2008), quienes evaluaron como afectó la exposición a metales pesados a la locomoción de esta especie; y el de Hu y col., (2008) quienes evaluaron la transferencia a la progenie de Fe y la inducción de defectos fenotípicos y comportamentales generados por el metal obtenido de esta manera. También el de Du y Wang, (2009), que estudiaron el efecto de metales pesados en el sistema nervioso de esta especie y el de Li y col., (2009), que evalúan la toxicidad en esta especie de la microcystina-LR.

Finalmente, se puede mencionar que en Latinoamérica se encuentra el trabajo de Murillo y Diaz (2002), en el que se evaluó la toxicidad de cromo, cobre y el efluente de cromado de una industria metalomecánica, utilizando como organismo de prueba a un nematode de vida libre, *Panagrellus redivivus*.

CAPÍTULO V
DISTRIBUCIÓN DE *Chordodes nobilii*

DISTRIBUCIÓN DE *Chordodes nobilii* EN ARGENTINA

En Argentina, la distribución de *Chordodes nobilii* es amplia. Se pueden mencionar varios sitios de colecta. Para la provincia de de Buenos Aires: Sierra de La Ventana, arroyo El Loro 38º08'00"S, 38º08'00"W, (1macho, de Villalobos y col., 2005), Sierra de la Ventana 3 hembras (Miralles, 1989), Sierra de La Ventana, río Sauce Grande 38º05'00"S, 62º13'00"W (4 machos, de Villalobos y col. 2005), Balcarce 37º45'00"S, 58º18'00" (1 hembra, de Villalobos y col., 2005). En la provincia de Cordoba: Cordoba 31º24'00"S, 64º11'00"W (1 hembra, de Villalobos y col., 2005), Cosquin (1 hembra, Camerano,1901), Cura Brochero (3 hembras, Miralles, 1989), El Durazno 31º20'15"S, 64º40'09"W (1macho, de Villalobos y col., 2005). En la provincia de San Luis: Villa Larca, Aguas Blancas, arroyo San Ignacio (32º 38'09"S, 64º57'06"W) (2 machos, 1hembra, de Villalobos y col., 2005), Carpinteria, arroyo Piedra Blanca (1024m) (32º24' 43"S, 64º58'47"W) (3 machos, de Villalobos y col., 2005).

ÁREA DE COLECTA DE *Chordodes nobilii*

La zona donde se realizaron las colectas de los adultos de *Chordodes nobilii* se localiza dentro de la llanura pampeana. A la estructura de la vegetación natural de esta región se la puede definir como un dominio de la estepa graminosa, formada por grandes matas del género *Stipa* (Cabrera, 1971). Existen varias comunidades que pueden considerarse climáxicas, siendo la más común la estepa de flechillas. Originalmente las gramíneas tenían un predominio absoluto y los árboles estaban ausentes. Actualmente, el paisaje de la llanura pampeana es distinto, ya que ha sido modificado por diversos factores antrópicos como, la introducción de árboles exóticos, la urbanización, las vías de comunicación, obras de ingeniería y la agricultura y ganadería, siendo las dos últimas las principales actividades desarrolladas en esta región. Dentro de la llanura se diferencian dos sistemas serranos, ubicados hacia el Sur de la provincia de Buenos Aires, el Sistema de Ventania y el Sistema de Tandilia.

El Sistema de Ventania o Sistema de Sierras Australes de la provincia de Buenos Aires, está formada por un conjunto de elevaciones bien definidas. El conjunto, que se dirige en sentido Noroeste-Sureste, cubre una longitud de 175 km y alcanza un ancho máximo de 50 km. En él pueden distinguirse dos zonas claramente diferenciables, una formada por las Sierras de las Tunas y de Pillahuincó hacia el este, y otra occidental que comprende a las Sierras de Puan, Curamalal, Bravard y Ventana. Estas sierras forman la mayor divisoria de aguas del Suroeste de la provincia de Buenos Aires. El sistema se encuentra interrumpido frecuentemente por valles transversales que toman el nombre local de "abras". Fitogeográficamente estas sierras se ubican en el Distrito Pampeano Austral, de la provincia Pampeana. Por la insolación que reciben, la presencia de vegetación y la diferencia de temperatura y humedad del aire, desde el punto de vista fisiográfico, se pueden distinguir las laderas umbrías (las orientadas al Norte) de las solanas (las orientadas al Sur). Las mediciones realizadas entre ambas vertientes separadas por 30 m de distancia, mostraron una diferencia de 2 a 5 ºC de temperatura y de 3 % a 15% en los valores de humedad, generando diferencias en la biota. Frente a una máxima insolación en verano y primavera, la capacidad evaporante del aire es elevada y las oscilaciones térmicas diarias y anuales son marcadas. La flora, principalmente herbácea se caracteriza por soportar bien el calor y la sequía y su cobertura es casi del 100%, en tanto que la vegetación arbórea no cubre el 10%. La ladera umbría recibe sol de dos a cinco horas al día en primavera y verano mientras que la mayor parte del año permanece sombría, aquí se observa un porcentaje alto (70% a 80%) de vegetación arbórea. En esta zona el relieve posee pendientes que pueden ser muy pronunciadas (entre 15 y 80%). Los cursos de agua en este sistema tienen un carácter torrencial y forman cuerpos de agua temporarios y permanentes. Los arroyos de aguas cristalinas que integran el paisaje, crean condiciones diferentes en sus márgenes lo que permite el desarrollo de una biota acuática bien característica (Cabrera, 1971; Cabrera, 1976; Gil y Campo de Ferreras, 2006a; Gil y Campo de Ferreras, 2006b).

Es importante destacar que en los ríos y arroyos de la zona se han estudiado 19 especies de Gordiida (de Villalobos y Voglino, 2000; de Villalobos y col., 2000, 2003b, 2004; 2005; de Villalobos y Restelli, 2001; Miralles, 1981; Miralles y de Villalobos, 1993, 1996a, 1996b; Zanca, 2003).

CLIMA

El Suroeste de la provincia de Buenos Aires queda comprendido en la faja zonal de los climas templados, con estaciones térmicas bien diferenciadas. No se han encontrado datos climatológicos oficiales actuales del área de Sierra de la Ventana específicamente, la estación del Servicio Meteorológico Nacional, Sierra de la Ventana, registró información desde 1961 a 1980 (Gil y Campo de Ferreras, 2006). La temperatura media anual en la zona es de 15 °C, en el mes más frío (julio) la temperatura media es de 7°C, y en el más caluroso (enero) es de 23,5°C. Las precipitaciones anuales oscilan entre 650 y 950 mm. Los períodos de lluvias no son regulares a lo largo del año, sino que se concentran principalmente durante primavera y otoño, los mayores registros se producen entre octubre y abril. En tanto que los meses de invierno son los más secos. Esto hace que el río Sauce Grande presente variaciones muy importantes en el nivel de agua y en la velocidad de corriente hasta su llegada al dique Paso de Piedras, luego del cual su caudal depende de los niveles de erogación del embalse. Las lluvias torrenciales desencadenan esporádicamente crecidas, pudiéndose observar por los procesos de trasporte y sedimentación que se generan en la llanura de inundación de los arroyos y ríos de la zona, que se caracterizan por su alta capacidad energética (Aduriz y col., 2003; Gil y Campo de Ferreras, 2006a; 2006b; Lopez Cazorla, 2003; Vouilloud y col., 2005).

CUENCA DEL RÍO SAUCE GRANDE

El río Sauce Grande nace en el sector centro oriental de las Sierras Australes, a 500 m. s.n.m, corre con dirección Norte – Sur y desemboca en el litoral atlántico argentino, luego de atravesar gran parte del piedemonte y llanura pampeana, conformando la cuenca del Sauce Grande. Ésta es la red de drenaje más importante del área de Bahía Blanca, que comprende tres secciones, cuenca alta, media y baja. La cuenca alta, donde se ubican los arroyos en los que se realizaron las colectas de adultos de *Chordodes nobilii*, se extiende desde su naciente en el cordón serrano de Ventana hasta el dique Paso de las Piedras, abarcando parte de los partidos de Tornquist, Coronel Pringles y Coronel Suárez (Figuras 1.5.1 - 1.5.3, página 34, 35 y 36). En esta sección el río Sauce Grande tiene 75 km de longitud y colecta el agua, de tributarios secundarios, en una superficie de 1.490 km^2.

Las márgenes en la zona son asimétricas y presentan en ambos lados pendientes diferentes. En las orillas encontramos vegetación principalmente herbácea y en algunos sectores crecen arbustos o árboles. Por lo general sus orillas se encuentran rodeadas de manchones de juncos, la comunidad dominante está formada por juncales de *Scirpus californicus* y los "totorales" conformados principalmente por *Typha dominguensis*. Donde la pendiente de los barrancos permite el desarrollo de especies herbáceas, no se evidencia socavamiento o desprendimiento de suelo. Esta vegetación reduce la velocidad del agua, refuerza el material del barranco incrementándose la resistencia a la erosión y por ende la estabilidad lateral del canal. Las algas predominantes son *Baetis inops*, *Spirogyra* sp., *Zygnema* sp. y *Oscillatoria* sp.. L (Gil y Campo de Ferreras, 2006; Lopez Cazorla, 2003; Vouilloud y col., 2005; Zavala y Quattrocchio, 2001).

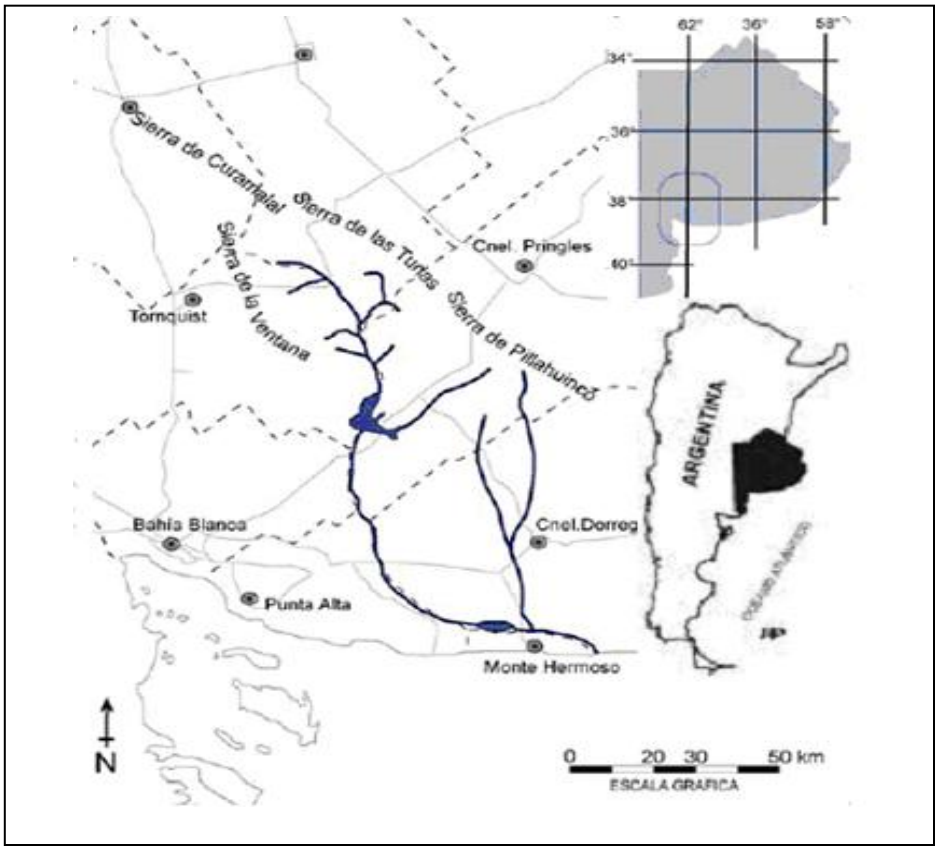

Figura 1.5.1. Ubicación de la cuenca del río Sauce Grande. Basada en Gil y Campos de Ferrara, 2006.

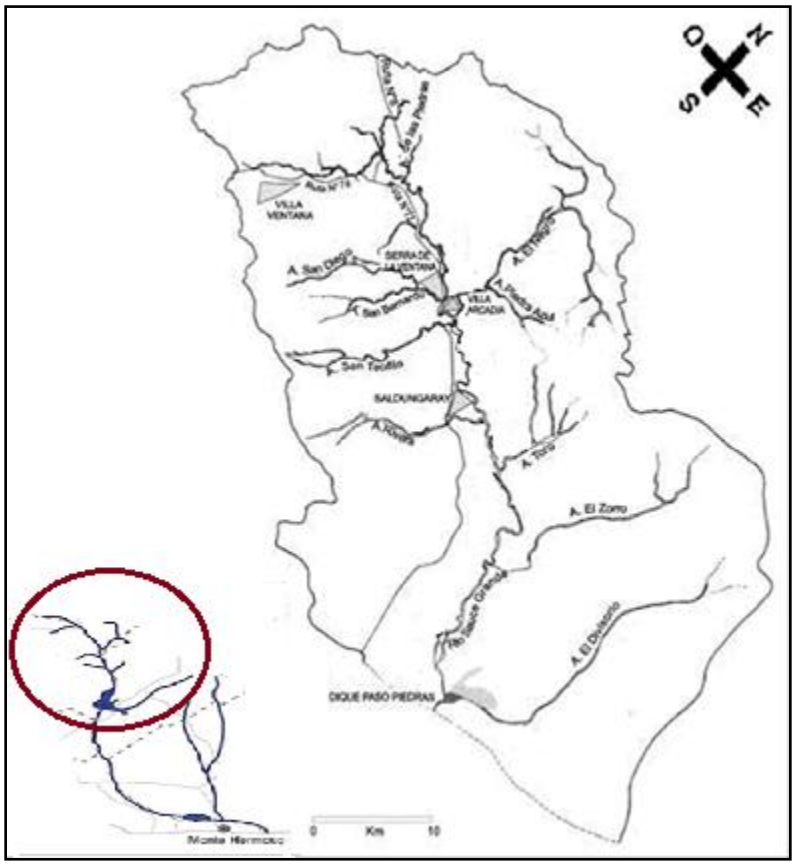

Figura 1.5.2. Cuenca alta del río Sauce Grande. Se observan varios de los arroyos donde se realizaron las colectas y las localidades cercanas. Basada en Vouilloud y col. (2005).

En la figura 1.5.3 (página 36) la imagen satelital abarca, en sentido NO - SE, hasta la localidad de Saldungaray y el arroyo Rivera. Observándose la predominancia de campos de cultivo y áreas serranas en detrimento de áreas urbanas.

Figura 1.5.3 Vista satelital del sector de muestreo en la cuenca alta del río Sauce Grande. Imagen tomada de Google Earth. Imágenes 2010 TerraMetrics.

Los arroyos de la zona son heterogéneos (Figuras 1.5.4 -1.5.7, páginas 37, 38, 39 y 40), de anchos muy variables, con sectores de mucha velocidad hasta sectores estancados y de escasa profundidad (15-60 cm). Pueden tener un cauce rocoso (guijarros de tamaño variado), pero los sectores arenosos, barrosos y/o arcillosos varían según el arroyo, como es el caso del arroyo Rivera. La materia orgánica es de escasa a abundante, dependiendo del sector del arroyo. El agua es casi siempre transparente (muy pocas veces semitransparente o turbia). Muchos de los sectores de los arroyos donde se realizaron los muestreos presentan plantas acuáticas arraigadas y emergentes. Las plantas flotantes y las algas verdes filamentosas en general se encuentran ausentes o son relativamente escasas. Los márgenes están profusamente vegetados, con sectores que presentan árboles o arbustos, que van aumentando en abundancia a medida que los

cursos se hacen mayores e ingresan en las zonas de influencia de las distintas localidades. El arroyo El Loro en las zonas donde se realizaron los muestreos, de manera distintiva, presenta los márgenes arbolados, en general de manera densa, generando áreas casi siempre sombrías.

Figura 1.5.4. Arroyo Rivera.

En el río Sauce Grande hasta 1973 el agua circulaba libremente hasta la laguna El Sauce y eventualmente entraba en contacto con el mar. En ese año se pone en operación el dique Paso de las Piedras, y se forma un lago con una superficie que oscila alrededor de las 3.000 ha, que retiene prácticamente toda el agua que escurre. El embalse constituye en la actualidad la principal fuente de abastecimiento de agua potable para las ciudades de Bahía Blanca y Punta Alta, y para el polo industrial cercano. La calidad del agua de este dique esta influenciada por el uso que hace el hombre de la tierra y otros recursos naturales vecinos al sistema acuático, y es obvia la importancia de mantenerla libre de contaminantes. El nivel de eutrofización en aumento de las aguas del embalse es atribuido a distintos factores que ocurren aguas arriba, tales como un incremento del uso de fertilizantes, la erosión hídrica por sobrepastoreo y mayor laboreo del suelo y el incremento poblacional (Aduriz y col., 2003; Lopez Cazorla, 2003; Vázquez y Fernandez, 2005; Vouilloud y col., 2005).

USO DEL SUELO EN LA ZONA DE ESTUDIO

La economía de la zona se basa fundamentalmente en actividades agrícolas y ganaderas (Informe Ediciones INTA, 2002), que co-existen con actividades recreativas y urbanas (en las márgenes del río Sauce Grande se asientan las localidades turísticas de Sierra de la Ventana y Villa Arcadia), generando un paisaje casi exclusivamente rural que caracteriza la zona de estudio, con campos de cultivo desarrollados sobre los valles y en algunos casos sobre los faldeos de las sierras. Los cultivos agrícolas se ordenan en dos grupos: de cosecha fina y de cosecha gruesa. Entre los primeros los más sembrados son el trigo, fundamentalmente, y la avena, mientras que entre los últimos sobresalen en orden decreciente: girasol, sorgo granífero y maíz. El cultivo de soja, un cultivo de cosecha gruesa, se incorporó en el año 2000. La cosecha fina es la principal actividad agrícola, ya que ocupa en promedio el 75,7 % de la superficie destinada a la agricultura en toda el área considerada. La mayor parte de la superficie ganadera de toda la cuenca alta ocupa recursos de bajo valor nutritivo como son el campo natural y las sierras. La labranza convencional, el control químico de malezas, el uso de fungicidas y la fertilización son las tecnologías más adoptadas (Aduriz y col., 2003; Vázquez y Fernandez, 2005; Gil y Campo, 2006, 2007). En la Tabla 1.5.1 (página 39) se presenta un listado de las tecnologías más frecuentemente utilizadas por los productores que tienen relación directa con algún tipo de degradación y/o contaminación de los suelos.

Figura 1.5.5. Arroyo Piedra azul aguas arriba.

Tabla 1.5.1. Porcentaje de utilización de algunas tecnologías en las actividades agrícolas y ganaderas. Obtenida de Aduriz y col., 2003.

Tecnologías utilizadas	***Predios (%)***	***Superficie destinada (%/Sup. Total)***
Control de la erosión hídrica	40.9	11.1
Labranza convencional	70.7	27.7
Siembra directa	36.1	12.2
Control químico de la maleza	88.5	32.9
Control químico de insectos	17.3	3.5
Control químico de hongos	71.9	25.5
Fertilización	61.6	21.9

Aduriz y col. (2003) realizaron un estudio durante los ciclos 1998, 1999 y 2000, basándose en la hipótesis que la intensificación de la agricultura, que se registra en diversas regiones de nuestro país estaría provocando la degradación y contaminación de los suelos. Cuando este fenómeno ocurre en suelos con pendientes marcadas, como los de la cuenca alta del río Sauce Grande, es muy probable que se produzca un arrastre de

Figura 1.5.6. Desembocadura del arroyo Piedra azul en el arroyo El negro.

contaminantes físicos y químicos hacia el río y, por ende, hacia el dique Paso de las Piedras. En ese estudio se determinó que, en el promedio general de la cuenca alta del río Sauce Grande la superficie utilizada por la agricultura es del 28 % mientras que la ganadería ocupa el 72 % restante, por lo cual se la puede clasificar como predominantemente ganadera. En los resultados de ese análisis, que abarcó sólo un trienio, se observó una clara tendencia hacia la ganadería respecto de la agricultura y

muestran que no hubo incremento de la actividad agrícola en ese período, por lo tanto los autores concluyeron que no se produjo un efecto creciente de contaminación de las aguas del río Sauce Grande durante el período mencionado.

En el momento del inicio de las campañas a la zona de colecta, año 2004, aunque se observaba un cambio hacia la incorporación de nuevas tierras a la agricultura, la condición del área era la planteada por Aduriz y col. (2003), pero a lo largo del desarrollo de las sucesivas campañas en el curso de los siguientes 5 años, el aumento del área cultivada se hizo evidente.

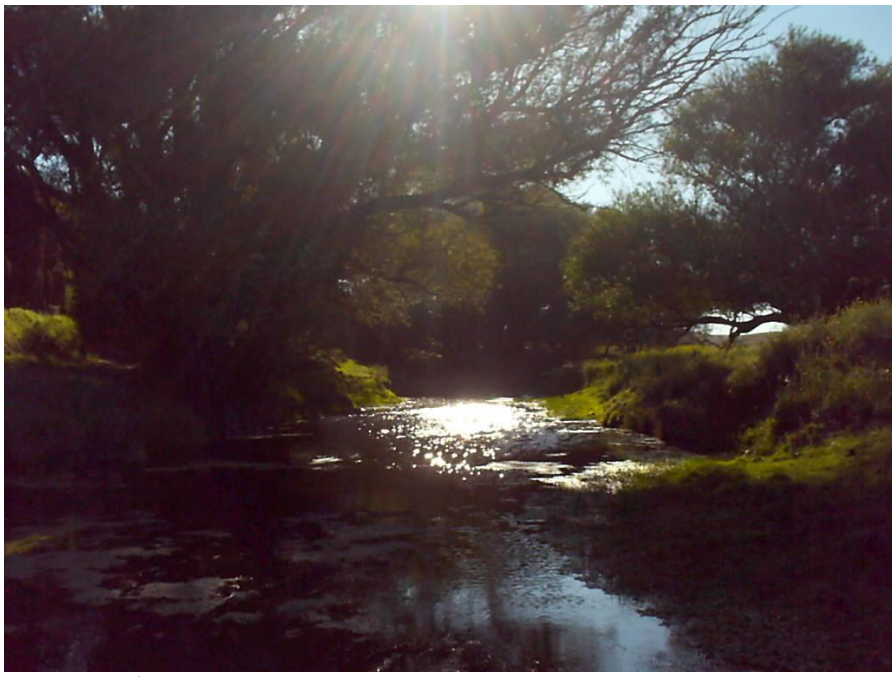

Figura 1.5.7 Arroyo El Negro.

CAPÍTULO VI
FUNDAMENTOS DE LA ELECCIÓN DEL TEMA

Las distintas actividades humanas están generando cambios en la estructura y la calidad de los ambientes de agua dulce.

La expansión urbana y de las actividades agropecuarias traen asociadas consecuencias como, la canalización de limnótopos, la industrialización, el aumento de sistemas de transporte y de producción de energía, la sobreexplotación de recursos y el exceso de población, desencadenando el deterioro y la modificación de los ambientes naturales. Todo esto atenta contra los ambientes naturales, produciendo la fragmentación del hábitat, la reducción significativa de la fauna autóctona, y finalmente el desplazamiento de poblaciones naturales (Natale, 2006).

Para realizar un manejo integral, uno de los puntos más importantes a tener en cuenta es generar información que tienda a responder interrogantes relacionados con el impacto que tienen las acciones antropogénicas sobre los recursos de una cuenca, los factores abióticos (suelo, agua, aire), bióticos y los factores culturales y socioeconómicos.

Entre las actividades antrópicas que impactan sobre el ambiente se destaca la liberación de poluentes, los que ejercen efectos directos e indirectos sobre la biota. El efecto directo que surge como emergente de la acción de los tóxicos sobre los diferentes niveles de complejidad es la reducción de la biodiversidad. Los efectos directos varían con la intensidad y la duración de la exposición al tóxico, generando diferentes respuestas en la biota, y los criterios predictivos para estimar los riesgos y establecer los niveles permisibles de contaminación se basan principalmente en la respuesta de las especies. Estos criterios se derivan de los test de toxicidad en los que se expone una especie modelo a un tóxico a evaluar.

Los poluentes pueden, sin embargo, ejercer efectos sobre las especies tolerantes por una serie de mecanismos ecológicos. Tales efectos se denominan efectos indirectos (o secundarios). Los efectos sobre las cascadas tróficas (los efectos indirectos mediados por interacciones consumidores-recursos) son un tipo de efecto indirecto bien estudiado, y son generalmente consideradas en términos de las interacciones “top-down” (influencia del predador sobre los niveles tróficos más bajos) y “bottom-up” (influencia de nutrientes-alimento-presa sobre los niveles tróficos más altos). Algunos sistemas acuáticos responden a ambos tipos de interacciones, bottom-up y top-down. Los efectos directos de

los contaminantes sobre las especies sensibles pueden alterar las interacciones de competición dentro de los grupos resistentes de las comunidades de productores y consumidores. Las influencias directas de los contaminantes sobre herbívoros (por ejemplo, a través de la letalidad o alteraciones en el comportamiento, que se expresan a nivel de comunidad mediante un descenso en la producción) pueden llevar a una cascada de efectos indirectos sobre especies resistentes en otros niveles tróficos. Además, los tóxicos pueden influir directamente sobre especies '*keystone facilitator'* o *'foundation*' (especies que afectan a otras especies a través de sus modificaciones en el ambiente), y con ello dar lugar a cambios en la abundancia de especies asociadas (Fleeger y col., 2003).

Los estudios realizados han demostrado que, dentro de los organismos acuáticos, los invertebrados son más sensibles que los vertebrados (Natale, 2006). Se debe considerar que los bioensayos para evaluar los efectos ecotoxicológicos en invertebrados han sido focalizados principalmente en organismos productores y consumidores, y en mucha menor medida en relaciones interespecíficas. Aunque en los últimos 15 años aumentó la información en lo que se refiere a los efectos de diferentes tóxicos sobre parásitos (Bergey y col., 2002; Donkin y Williams, 1995; Gheorghiu y col., 2007; Lafferty, 1997; Mackenzie, 1999; Sures y col., 1999; Sures, 2004, 2008; Zuk y col., 1997), la misma es aún escasa.

Los gordiidos, por las particularidades de su ciclo de vida, juegan un rol importante en el ecosistema, permiten una conexión entre los cuerpos de agua dulce y los ecosistemas terrestres que los rodean, ya que este grupo incluye en su ciclo de vida estadios dulceacuícolas, los embriones, las larvas y los adultos, que pueden ser las presas de distintos organismos (Cochran y col. 1999; de Villalobos, y col., 2008; Kinziger y col., 2002; Ponton y col., 2006; Ruiz y Figueroa, 2005), y los juveniles, que parasitan principalmente insectos terrestres.

En el mundo se han inventariado 360 especies vivientes de Gordiida, de las cuales 46 integran la biodiversidad de nuestros humedales. En la actualidad la biodiversidad global está en crisis debido a la actividad humana sobre los ambientes naturales, y los gordiidos en particular no escapan a esta realidad, ya que muchas especies pueden estar en peligro de extinción debido a la alteración de los ambientes donde viven. Muchos de los ecosistemas terrestres que rodean los cuerpos de agua dulce en que se encuentran los Gordiida han sido modificados en los últimos años debido a las distintas actividades antrópicas, de las cuales podemos destacar la actividad agrícola ganadera. Junto a este

hecho se debe destacar que durante los años previos al inicio de esta tesis se observó una disminución de la abundancia del grupo en varios cuerpos de agua de la cuenca del Sauce Grande. Por tanto, se plantea la posibilidad de que las modificaciones de los hábitats estén afectando la supervivencia del grupo, ya que los distintos estadios de vida libre (los huevos, las larvas y los adultos) pueden estar expuestos directamente a los contaminantes. En consecuencia se hace imprescindible evaluar la sensibilidad de este grupo a distintas variables que puedan afectarlos. Esta realidad amplía necesariamente los estudios biológicos de los gordiidos hacia su evaluación ecotoxicológica, produciendo información sobre la viabilidad de un grupo que cumple un importante rol en el biocontrol de insectos de interés médico y agronómico, generando una nueva visión al tratarse de un grupo parásito acuático con progresión en el ambiente terrestre.

Si los gordiidos son sensibles a los poluentes, padeciendo los efectos directos de los mismos, es factible que, debido a su posición en el ecosistema, jueguen un rol importante en los efectos indirectos de los poluentes sobre otras especies.

La elección del área de Sierra de la Ventana está estrechamente ligada al hecho de que aún conserva zonas dentro de la cuenca que podemos considerar prístinas, a pesar que coexisten con una importante presión antrópica, debido a una extensa actividad agropecuaria (Informe Ediciones INTA, 2002), lo que permite suponer posible contaminación por agroquímicos de algunos cuerpos de agua de la región, tanto por vertido directo como por efecto de deriva; sumado al hecho de que los arroyos de la zona reciben descargas domiciliarias.

Chordodes nobilii se seleccionó como la especie tipo para estos estudios considerando que, en cuanto a su ocurrencia es la más representativa en la zona (de Villalobos y col. 2004). Finalmente, otro punto importante a considerar es que *C. nobilii* es una especie nativa.

SECCIÓN II

HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

CAPÍTULO I
PLANTEO DE HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En función de lo antedicho, en el capítulo VI de la sección anterior, acerca de la disminución de la abundancia del grupo en varios cuerpos de agua de la cuenca del Sauce Grande (como el arroyo San Bernardo, río Sauce Grande), y planteándose la posibilidad de que los estadios de vida libre estén expuestos directamente a contaminantes se generó la siguiente **HIPÓTESIS**:

Los Gordiida (Nematomorpha) son vulnerables a la disminución de la calidad del agua de su ambiente. El estrés ambiental altera el normal desarrollo del grupo, afectando su capacidad de infección y abundancia en los ambientes acuáticos donde se desarrollan.

OBJETIVOS

Para probar la hipótesis planteada se propone el siguiente objetivo:

Evaluar en distintas etapas, huevo, larva y adulto, del ciclo de vida de una especie de Gordiida, *Chordodes nobilii* el grado de sensibilidad a variables ambientales y al estrés causado por exposición a contaminantes.

Se establecen los siguientes **objetivos particulares**:

- Diseñar un protocolo de ensayo adecuado para este grupo en particular, considerando las distintas etapas que presentan durante el ciclo de vida.

- Seleccionar puntos finales compatibles con el ciclo de vida del grupo y el tipo de bioensayo.

- Evaluar la capacidad de los puntos finales seleccionados para informar acerca de la sensibilidad de *Chordodes nobilii* a estrés por exposición a tóxicos.

- Establecer el rango de tolerancia térmica en las distintas etapas del ciclo de vida (desarrollo embrionario, larvas y adultos).

- Evaluar mediante el uso de bioensayos diseñados a tal fin el efecto sobre las diferentes etapas del ciclo de vida de *Chordodes nobilii* a la exposición a
  - Tres tóxicos referentes
  - Tres plaguicidas

- Evaluar si los estadios preparasitarios de *C. nobilii* mantienen su sensibilidad a los plaguicidas en agua de su ambiente natural.

- Determinar la capacidad de esta especie de actuar como bioindicadora de contaminación.

A partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental de esta Tesis surgieron preguntas que determinaron el planteo de objetivos adicionales:

- Establecer la línea de base para la capacidad infectiva de esta especie, a partir de los resultados obtenidos para los controles durante la realización de bioensayos.

  - Determinar si existe variabilidad en la capacidad infectiva y que factores influyen sobre ésta.

- Determinar sensibilidad diferencial entre los estadíos preparasitarios a los diferentes tóxicos y a la temperatura.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

Este capítulo se divide en:

Metodología en Campo, Metodología en Laboratorio, y, Bioensayos

METODOLOGÍA EN EL TRABAJO DE CAMPO

La actividad de campo consistió en la colecta de los adultos, así como en la toma de muestras de agua y sedimento, y medición de parámetros fisicoquímicos.

Desde el 2005 hasta el 2009, se realizaron viajes de campaña a la Región de la Ventania donde se efectuaron muestreos en arroyos de primer y segundo orden pertenecientes a la cuenca alta del río Sauce Grande.

Los adultos de *Chordodes nobilii* se colectaron en los meses de marzo. La selección de los sitios de colecta se realizó considerando que los mismos tuvieran el menor impacto antrópico posible (Figura 2.2.1, página 47). Entre estos arroyos se pueden mencionar, el arroyo El Negro, Piedra Azul, El Loro, Las Tunas y El Atravesado. La colecta se efectuó mediante técnicas manuales, coladores, redes de alambre, y mosquitero de malla fina. Los adultos capturados se trasladaron al laboratorio separados en recipientes, según los arroyos de origen, en cámaras refrigeradas.

La determinación taxonómica de los adultos de *Chordodes nobilii* se efectuó según de Villalobos y Zanca, (2001).

En las distintas campañas se determinaron parámetros fisicoquímicos del agua mediante censores portátiles. La temperatura se registró con un termómetro de mercurio con escala a la décima de grado. Mediante sondas intercambiables de un censor ATC Probe, SPER Scientific Ltd., se midió el pH en unidades de pH con un rango de 0 - 14, la conductividad (C) en unidades de ms con un rango de 0.2 – 1.999, sólidos totales disueltos (TSD) en unidades de mg/L con un rango de 132 – 1320 y el oxígeno disuelto (OD) con unidades de mg/L con un rango de 0 - 20.

Figura 2.2.1. Colecta de adultos en el arroyo Piedra Azul.

Las muestras de agua y sedimento e tomaron en distintos puntos del río Sauce Grande de acuerdo a procedimientos protocolizados (APHA 1992, IRAM 2003), las que se trasladaron al laboratorio, para su análisis.

METODOLOGÍA EN EL TRABAJO DE LABORATORIO

Mantenimiento de los individuos colectados en el campo

El mantenimiento de los individuos colectados y los bioensayos se realizaron en la Unidad de Servicios en Bioensayos y Diagnósticos Ecotoxicológicos (SERByDE), Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y en el Laboratorio del Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA), Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Lujan.

En el laboratorio, los adultos se mantuvieron en los recipientes en los que fueron transportados, a los que paulatinamente se les fue cambiando el agua de los arroyos por agua potable, libre de cloro. Se mantuvo a los adultos con aireadores y a temperatura regulada (23± 2º C), a la espera de la formación del nudo gordiano y cópula. Luego de las cópulas, se aislaron las hembras en peceras individuales hasta la oviposición (Figura 2.2.2, página 48).

Figura 2.2.2. Se observa una hembra realizando la oviposición sobre la superficie inferior de la piedra.

Medición de parámetros físico-químicos de agua y sedimento del río Sauce Grande (SG)

En el laboratorio de PRODEA en las muestras de agua se midió conductividad (conductímetro portatil Hanna HI9033), pH (pHmetro Orion), OD (oxímetro Hanna HI9142) dureza (método volumétrico con kit comercial, Aquamerck), amonio (método del azul de indofenol) y fosforo reactivo soluble (método del ácido ascórbico) (APHA 1995). La determinación de las concentraciones de plaguicidas organoclorados y organofosforados, se analizaron en el laboratorio Proanálisis S.A., mediante cromatografía gaseosa. Para la determinación de los primeros se utilizó el método GC-ECD, y en el caso de los organofosforados el método utilizado fue GC-NPD con una sensibilidad de 0.03 µg/L, y 0.02 µg/L respectivamente.

Las concentraciones de metales pesados fueron determinadas por espectrometría de absorción atómica (Método 3111B), en el laboratorio del CIDEPIN.

BIOENSAYOS

DISEÑO DE LOS PROTOCOLOS DE ENSAYO

Uno de los primeros desafíos de este trabajo de investigación fue la falta de antecedentes en la evaluación ecotoxicológica del Phylum Nematomorpha. Se realizaron

ensayos preliminares para establecer el rango de sensibilidad de adultos, huevos y larvas a distintos contaminantes determinándose así un protocolo de ensayo básico.

El diseño de los bioensayos tomó como referencia a los realizados con los primeros estadíos de vida de diferentes organismos (Bellas y col., 2003, Measures, 1996, Popham y Webster, 1979; Samailoff y col., 1980, etc), y los lineamientos para bioensayos de toxicidad con especies estandarizadas (USEPA, 1994) y con especies nativas (Ferrari y col., 1989, 1997, Ferrari y col., 1998; Demichelis y col., 2001). En función del análisis de los datos bibliográficos y de las características particulares de los gordiidos se protocolizó un diseño experimental para la especie de ensayo y se seleccionaron las etapas del ciclo de vida a utilizar en los mismos.

Se plantearon ensayos de tipo estático, en ambiente de temperatura y fotoperíodo controlados (cámara de incubación con temperatura, humedad y fotoperíodo programables). Los controles se realizaron en agua reconstituida (Weber, 1993) de dureza comparable a la del medio natural. En la figura 2.2.4 (página 53), se muestra un diagrama representativo de los bioensayos realizados con huevos y larvas de *Chordodes nobilii*.

BIOENSAYOS CON EMBRIONES

A partir de las puestas realizadas por hembra se toman muestras de las ristras de huevos y se observan a Microscopio óptico (Wild Heerbrugg) para determinar estado de desarrollo. Si en las muestras se encuentra una gran proporción de blástulas, se separan segmentos de la ristra de aproximadamente 2 mm de longitud, que incluyen aproximadamente 4000 huevos. Cada segmento es fragmentado y corresponde a la biomasa inicial por réplica de cada ensayo.

El ensayo con embriones involucra 3 fases o etapas: Exposición, Post-Exposición e Infección Experimental (Figura 2.2.3, página 52).

1) <u>Exposición</u>: durante 96 hs a la variable considerada. Al finalizar se exponen los huevos a condiciones control.

2) <u>Post – Exposición</u>: de tiempo variable en función del grado de avance del desarrollo embrionario hasta que una proporción no inferior al 50% alcance el estadío de Larva Libre.

Semanalmente, se toman muestras de los segmentos expuestos y de los controles para determinar el estado de desarrollo de los embriones. Si se observan larvas libres en la muestra, se contabilizan los embriones viables (larva en huevo y larva libre) y embriones no viables (ENV). Cuando la proporción de larvas libres alcanza el 50% se continúa con la siguiente etapa. Esta práctica se realiza para todos los tratamientos.

Las observaciones se realizan de la siguiente manera. A un aumento de 10X3 se ubica la muestra en el portaobjeto, luego se aumenta a 10X10 se selecciona un sector de la muestra al azar, entonces se procede a aumentar hasta 10X40 y se contabilizan 25 individuos (embriones o larvas), a los que se determina estadío de desarrollo embrionario. No se contabilizan huevos vacíos como larvas libres (LL) ya que si los huevos se encuentran vacíos no necesariamente puede deberse a la eclosión de las larvas. Los huevos que presenten anormalidades, como material celular destruido, que se encuentren retraídos, etc., se denominan embriones no viables (ENV). Contabilizados los primeros 25 individuos, se disminuye el aumento hasta 10X3 nuevamente, se selecciona otro sector al azar y se repite la operación 3 veces más, hasta que se alcance el número total de 100 individuos/réplica. En los ensayos realizados en esta tesis se utilizaron tres réplicas por tratamiento, por lo tanto, se contabilizaron un total de 300 embriones por cada tratamiento.

La etapa de post-exposición finaliza cuando la cantidad de LL en la muestra es $\geq$ 50% (aproximadamente 25 días).

Esta metodología fue elegida porque los embriones de los Gordiida que se encuentran en la misma ristra de huevos pueden desarrollarse a ritmos distintos (Montgomery, 1904; Dorier, 1930; Zanca y col., 2007).

3) Infección Experimental: exposición del hospedador a larvas de *Chordodes nobilii* durante 72 hs.

Debido a la escasa movilidad de las larvas, para determinar su viabilidad se evalúa la capacidad infectiva de las larvas mediante un índice de infección.

Como hospedadores en esta Tesis se utilizaron larvas de *A. aegyptii* (Díptera), en segundo y tercer estadio, obtenidas en laboratorio (CEPAVE o CIPEIN - CITEFA).

La muestra del segmento conteniendo un porcentaje $\geq$ 50% de LL de *C. nobilii* se coloca en recipientes con 12 ml de agua declorinada, con germen de trigo como alimento para las 30 larvas de *A. aegyptii* (de Villalobos y col., 2003a) colocadas en ese recipiente. Durante 72 hs se mantienen en contacto a las larvas de *C. nobilii* con los hospedadores. Al finalizar la tercera etapa se fija a los hospedadores en alcohol, para observarlos

posteriormente en microscopio óptico y determinar si fueron infectados por las larvas de *C. nobilii*, se considera que la larva de *C. nobilii* infectó si se la encuentra en el hemocele (Figura, 2.2.4, página 53). Para la observación y conteo de larvas infectactanes por hospedador a microcopio, y a fin de optimizar la objetividad del observador se aplico la modalidad de "experimento ciego".

La viabilidad de las larvas eclosionadas se evalúa mediante el índice de infección, Infection Index Mean Abundance, IIMA (Bush y col., 1997), que consiste en la división del total de larvas de *C. nobilii* que lograron infectar por el total de hospedadores observados.

Los puntos finales considerados son: la inhibición del desarrollo embrionario, mediante la proporción de Embriones No Viables (ENV), al finalizar la segunda etapa experimental, y el poder infectivo de las larvas que eclosionaron (IIMA-E), al finalizar la tercera etapa experimental.

El bioensayo sobre el desarrollo embrionario de *C. nobilii* se considera válido cuando la proporción de ENV en el grupo control es ≤ 10%.

BIOENSAYOS CON LARVAS

Las piezas de las ristras de huevos se mantienen en recipientes con agua corriente declorinada hasta que los embriones alcanzan el estado de larva libre (LL). Luego de observar muestras de las posturas, confirmando una proporción de LL ≥ 50%, se inicia el bioensayo. La metodología inicial es la misma que la descripta para el bioensayo de desarrollo embrionario.

El protocolo experimental consiste en dos periodos consecutivos:

1) Exposición: El tiempo de exposición es de 48 hs. El procedimiento y las condiciones experimentales, son los mismos que para los bioensayos de desarrollo embrionario.

2) Infección Experimental: exposición del hospedador (larvas de *Aedes aegyptii*) a larvas de *Chordodes nobilii* durante 72 hs. El procedimiento es el mismo que el seguido en el caso de desarrollo embrionario para el tercer periodo.

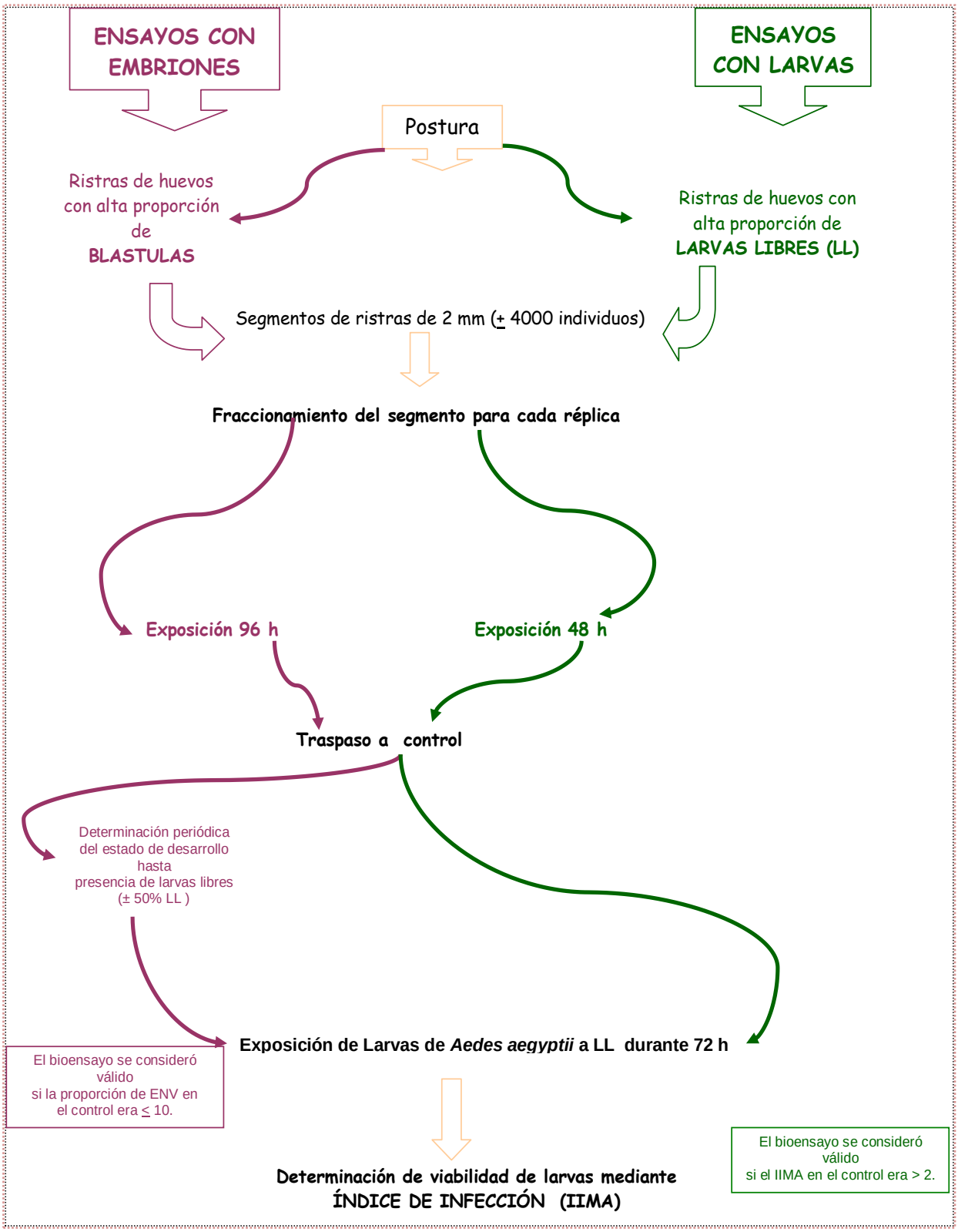

Figura 2.2.4. Esquema del desarrollo de los bioensayos para los estados preparasitarios de *Chordodes nobilii*.

Estos bioensayos se consideran válidos cuando el IIMA del grupo control es ≥ 2. Se consideró este valor luego de evaluar distintas infecciones realizadas en el laboratorio con muestras de *C. nobilii* que se mantuvieron en condiciones control.

Figura 2.2.4. Larvas de *Aedes aegypti* infectadas con larvas de *C. nobilii*, en el abdomen (A) y en los sifones respiratorios (B).

BIOENSAYOS CON ADULTOS

Para evaluar la supervivencia de los adultos se emplea un ensayo agudo, de 96 hs de exposición. Se utilizan recipientes con capacidad de 500 ml, con hasta 10 individuos por réplica. Cada 24 hs se controla la supervivencia de los individuos, la cual se evalúa en función de su normal actividad (natación, arrollamiento). Al finalizar el tiempo de exposición, los individuos expuestos se colocan en condiciones control. Se considera a los individuos muertos si aún luego de 48 hs en medio control no responden a estímulos mecánicos. El ensayo se considera válido cuando la mortalidad en el grupo control es ≤ al 10%.

BIOENSAYOS REALIZADOS CON TÓXICOS

Bioensayos con Embriones y Larvas: los tratamientos y controles fueron testeadas bajo condiciones semiestáticas (el medio fue renovado parcialmente cada 24 hs, para el recambio se procedió utilizando pipetas Pasteur descartables) y en oscuridad, para evitar la eventual fotodegradación del tóxico. El volumen empleado para las soluciones de ensayo y control fue de 1.5 ml, resultando en una densidad de 2500 a 3000 huevos/ml aproximadamente. Se utilizaron 3 réplicas por tratamiento. Finalizado el tiempo de exposición el medio fue remplazado totalmente por medio control (agua reconstituida o agua del medio natural) (Figura 2.2.5).

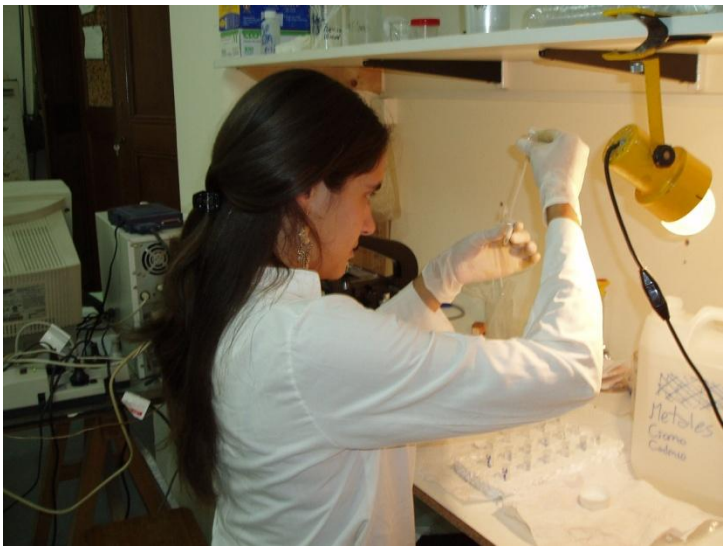

Figura 2.2.5. Recambio del medio de ensayo por medio control

Bioensayos con Adultos: se utilizaron recipientes de polipropileno conteniendo 500 ml de solución, ya sea para el medio de ensayo o el medio control (agua dura reconstituida), con cuatro réplicas conteniendo 5 machos cada una. Para evaluar la letalidad al tóxico se realizó un bioensayo de toxicidad aguda estático, que fue realizado siguiendo el procedimiento de ensayo límite (Baird y col., 1996).

La evaluación de ecotoxicidad en adultos se limitó solo al ensayo con Glifosato debido al escaso número de ejemplares con los que se contaba, en relación al número necesario para evaluar el efecto de un tóxico de manera adecuada. Al momento de de iniciar los estudios de ésta Tesis se carecía de conocimiento biológico suficiente sobre la dinámica de las poblaciones naturales de *C. nobilii*, por consiguiente, extraer una gran cantidad de ejemplares de su ambiente para realizar ensayos de letalidad en laboratorio,

podría causar una presión sobre la población potencialmente riesgosa. Consecuentemente, al priorizar el hecho de mantener la población natural no se realizó una extracción masiva de ejemplares del medio.

El diseño utilizado para evaluar la exposición a tóxicos se sustenta en la hipótesis que la exposición en un ambiente natural a contaminantes de origen antrópico es difusa y puntual. En el caso del desarrollo embrionario, la exposición se limita solo a un porcentaje de ±15% (un porcentaje muy pequeño) del tiempo total necesario para completarlo.

En la tabla 2.2.1 (página 56), se muestran las condiciones de evaluación, resumidas, utilizadas en los bioensayos.

Tóxicos ensayados

Tóxicos de referencia (calidad pro análisis):

- Dodecil Sulfato de Sodio (DSS) Fluka. Número CAS 151-21-3. Nombre IUPAC dodecilsulfato sódico. Fórmula molecular $NaC_{12}H_{25}SO_4$
- Cromo, como Cromo hexavalente, (Cr^{6+}), Sigma, Número CAS 7778-50-9, Nombre IUPAC Heptaoxodicromato (VI) de potasio, Fórmula molecular $K_2Cr_2O_7$.
- Cadmio, como Cloruro de cadmio, (Cd^{2+}), J.T. Baker, Número CAS 10108-64-2, Fórmula molecular Cl_2Cd 2H2O.

Pesticidas

- Glifosato, grado técnico, 95% de pureza (Gly i.a.)
- Glifosato, Formulado, como ácido puro 35.2% (p/p) y como sal de isopropilamina 47.5%, (p/v) (Gly-F).
- Malatión, Formulado, 100% en formulación, (FSM).
- Carbendazim, grado técnico, 98% de pureza.

Los pesticidas fueron donados por el Área de Laboratorio de Formulados y Fertilizantes de SENASA y por Félix Menendez SRL.

Los ensayos con tóxicos referentes utilizaron como medio de dilución agua reconstituida dura (EPA) con la siguiente composición (mg/L): 192 $NaHCO_3$, 120 $CaSO_4$.2 H_2O, 120 $MgSO_4$, 8 ClK, pH 7.6-8.0, dureza 160-180 mg/L como CO_3Ca (Weber, 1993).

Los ensayos con pesticidas se pueden dividir en aquellos realizados con agua reconstituida (EPA) y aquellos realizados con agua del río Sauce Grande (SG). En todos los ensayos realizados con SG se corrió paralelamente un control en medio EPA.

En todos los casos se preparó una solución stock, en agua destilada, a partir de la cual se realizaron diluciones con el medio de ensayo (EPA o SG) y se realizó la valoración analítica de las soluciones.

Las concentraciones nominales y analíticas para las soluciones madre de los tóxicos utilizados en los ensayos se listan en la tabla 2.2.2 (página 57), en tanto que en la tabla 2.2.3 (página 57) se indican las concentraciones nominales ensayadas.

Tabla 2.2.1 Resumen de las condiciones de evaluación usadas en la realización de los bioensayos para determinar la sensibilidad de los estadios preparasitarios de *Chordodes nobilii*.

Parámetros Bioensayos	***Condiciones***	
	Bioensayos Embriones	**Bioensayos Larvas**
Tipo de Bioensayo	Renovación semiestática	Renovación semiestática
Duración del Bioensayo	± 30 días	5 días
Duración de la Exposición	96 horas	48 horas
Temperatura	23±1ºC	23±1ºC
Foto período	Oscuridad	Oscuridad
Tipo de recipiente usado	Eppendorf de 3 ml	Eppendorf de 3 ml
Volumen de la solución	1.5 ml	1.5 ml
Renovación Parcial de la solución	Diariamente	Diariamente
Estadío de los organismos en el inicio	Blástula	Larva
Densidad de organismos	±2500/ml	±2500/ml
Replica tratamiento	3	3
Medio de Dilución	Agua reconstituida Dura	Agua reconstituida Dura
Régimen de alimentación	Ninguno	Ninguno
Punto Final	%ENV; IIMA-E	IIMA-L
Condición de aceptación	%ENV $\leq$ 10; IIMA-E > 2	IIMA-L $\geq$ 2

Tabla 2.2.2. Concentraciones nominales (CN) y analíticas (CA) de las soluciones madre en mg/L. Para los plaguicidas la concentración se expresa como ingrediente activo. [a] CA de los ensayos con embriones en medio EPA y SG, y con larvas en medio EPA; [b] CA del ensayo con larvas en medio SG; [c] CA de los ensayos con embriones en medio EPA y SG; [d] CA de los ensayos con larvas en medio EPA y SG; [e] CA para los ensayos con embriones y larvas en medio EPA y embriones en medio SG, [f] CA para el ensayo con larvas en medio SG.

Tóxico	***Concentración*** *Nominal*	***Concentración*** *Analítica*
Glifosato	370,53	334.1[a]; 390.2[b]
Carbendazim	2.5	2.8[c]; 2.35[d]
Malatión	100	73[e]; 157[f]
DSS	100	-
Cd	1000	-
Cr	1000	-

Tabla 2.2.3. Concentraciones nominales de las soluciones ensayadas.

Tóxico	**Concentraciones Nominales Ensayadas (mg/L)**					
Glifosato (i.a. y F)	0.07	0.40	0.75	1.5	3	6
Carbendazim	0.01	0.02	0.04	0.075	0.16	0.32
Malatión	0.05	0.075	0.1	0.15	0.3	-
DSS	0.1	0.5	1	2	4	8
Cd	0.5	1	2	4	8	-
Cr	0.5	1	2	4	8	-

Las determinaciones analíticas de las soluciones madre de Glifosato fueron realizadas por cromatografía iónica con columnas cromatográficas AG4-AS4 en INQUIMAE-FCEN-UBA. Las concentraciones analíticas de las soluciones madre de Malatión y Carbendazim fueron determinadas en Proanálisis, S.A.

Las concentraciones efectivas de Cd^{+2} y Cr^{+6} fueron determinadas mediante espectrometría de absorción atómica (Método 3111B, APHA, 1999) en CIDEPIN-CIC, Las concentraciones efectivas de DSS se determinaron mediante un ensayo de azul de metileno de sustancia activa, en Proanálisis S.A. Los límites de detección fueron de 0.05, 0.1 y 0.05 mg/L para Cd^{+2}, Cr^{+6} y DSS respectivamente.

PUNTOS FINALES

Los puntos finales considerados para los análisis estadísticos son:

- Proporción de Embriones No Viables (ENV).
- IIMA-E: Índice de infección para las larvas provenientes de ensayos de desarrollo embrionario
- IIMA-L: índice de infección para larvas expuestas (bioensayos de larvas).
- Supervivencia de adultos.
- CI_{50}: concentración inhibitoria del 50%

BIOENSAYOS PARA EVALUAR TOLERANCIA TÉRMICA

En este caso se efectuaron algunas modificaciones a los protocolos experimentales seguidos. En el caso de los ensayos con embriones y larvas, se modificó el recipiente y el volumen del medio de ensayo, ya que cada segmento se colocó en un recipiente con 12 ml de agua corriente declorinada (densidad: 292 individuos/mL). En el ensayo con adultos se utilizaron recipientes de vidrio, en los que se colocaron 10 adultos por réplica. Se emplearon dos réplicas por temperatura a evaluar. Previo al inicio de cada ensayo los adultos se aclimataron a la temperatura control (23 ±1 ºC) durante 7 días. La exposición a la temperatura de ensayo fue aguda.

Según la temperatura a ser evaluada (Tabla 2.2.4), se utilizó una cámara de cría, para determinar sensibilidad a altas temperaturas, y un refrigerador para determinar la sensibilidad a temperaturas bajo cero. El grupo control se mantuvo a temperatura constante (23±2°C).

Cumplido el tiempo de exposición (96 horas para embriones y adultos, y 48 horas para larvas) los recipientes conteniendo los grupos expuestos se colocaron a la temperatura control durante 24 horas. Se debe hacer la salvedad de que en el caso del ensayo con adultos, las temperaturas evaluadas de 38.5 y 40.5 °C fueron consecutivas.

Tabla 2.2.4. Temperaturas ensayadas.

Estadio	*Temperatura evaluada (ºC)*
Desarrollo embrionario	-3; 40.5
Larvas	-3; 40.5
Adultos	-3; 38.5; 40.5

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

En los ensayos de efecto de estrés térmico la significatividad estadística respecto de los controles, se evaluó mediante prueba t. En tanto que, en los restantes ensayos, para evaluar diferencias significativas entre control y expuestos se utilizó ANOVA de un factor con comparaciones posteriores de Tukey.

Para determinar la existencia de un efecto concentración dependiente se realizaron análisis de regresión solo para los grupos expuestos (en vista de las marcadas diferencias con controles desde la mínima concentración ensayada)

Todos los análisis se realizaron previa verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de la población de datos mediante la utilización de los test de Shapiro-Wilk y de Levene (Zar, 1996). Si los datos no mostraban distribución normal o no se comprobaba homogeneidad de varianzas, se realizaron transformaciones para cumplir con los supuestos. Se utilizaron las transformaciones, logarítmica, raíz cuadrada y arco seno (Zar, 1996; Sokal y Rohlf, 2002). Si los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza no se cumplían, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. La representación gráfica se realizó con la variable sin transformar. Todos los análisis estadísticos se realizaron a un nivel de significatividad de 0.05.

Se utilizaron los paquetes estadísticos InfoStat y SPSS.

Para evaluar la sensibilidad entre estadios a una misma variable (temperatura, y tóxico), y para evaluar el efecto del medio en la toxicidad de los plaguicidas, se realizaron comparaciones entre tratamientos cotejables. Para las comparaciones, los datos se analizaron utilizando la prueba t o la prueba de Mann Whitney, según cumplieran con el supuesto de normalidad o no.

Las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) para cada punto final en cada bioensayo, fueron calculadas por el método de interpolación linear, recomendado por USEPA, usando el software ICp (Versión 2.0) (Norberg-King, 1993).

Para el punto final, ENV, la CI_{50} fue definida como la concentración del tóxico que resultó en un 50% de desarrollo anormal de embriones. Para el punto final, IIMA-E, la CI_{50} fue definida como la concentración del tóxico que resultó en un 50% de la disminución de la capacidad infectiva de las larvas eclosionadas de huevos expuestos. Para el punto final IIMA-L, la CI_{50} fue definida como la concentración del tóxico que resultó en un 50% de supervivencia de las larvas expuestas.

SECCIÓN III

RESULTADOS

Consideraciones acerca de la Sección III Resultados

El orden en que se describen los resultados obtenidos de los bioensayos no necesariamente es el que se ha seguido en el desarrollo experimental de esta tesis, pero es el que mejor refleja la elaboración de los resultados.

Al inicio de este estudio en relación a la especie de ensayo (*C. nobilii*) solo se contaba con información taxonómica, biogeográfica y ciclo de vida. Es en este estudio en el que se realizaron los primeros ensayos de infecciones de esta especie en laboratorio. Es por ello que, de manera paradójica, el primer capítulo surge como resultado del estudio de los controles del total de ensayos realizados.

Durante el período de estudio se realizaron en total 40 bioensayos con huevos, larvas y adultos de *C. nobilii*. De estos 40 bioensayos, los primeros 10 permitieron mejorar el diseño del protocolo, establecer las condiciones de ensayo, y determinar rangos de sensibilidad. De los restantes 30 bioensayos solamente 3 no cumplieron con los criterios de aceptabilidad (embriones expuestos al Glifosato como formulado y al Cadmio, y larvas expuestas al Carbendazim). En resumen en ésta sección se exponen los resultados de 27 ensayos

CAPÍTULO I
ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE LAS LARVAS DE *Chordodes nobilii*

INTRODUCCIÓN

El éxito de la infección es crucial para la supervivencia de los parásitos, y los gordiidos no escapan a esta consigna. En este grupo las larvas que logran eclosionar son las que potencialmente son capaces de infectar y la viabilidad de las mismas estará dada por el éxito en la infección. Las larvas de los gordiida tienen la capacidad de infectar durante aproximadamente una semana luego de la eclosión, a distintos hospedadores, paratenicos ó definitivos.

Teniendo en cuenta que hasta el momento la información sobre la capacidad infectiva y el éxito reproductivo de los gordiidos es escasa (los estudios existentes corresponden a especies del hemisferio norte básicamente), que no existe un estudio que analice la capacidad infectiva de las larvas de *Chordodes nobilii* en particular, y que esta información es muy importante para comprender los resultados obtenidos a partir de esta Tesis, se hace necesario estudiar, analizar y determinar las características de la capacidad infectiva de la especie de estudio.

En el presente capitulo se exponen los resultados del análisis de la capacidad infectiva, de la variabilidad de la misma y los posibles factores que sobre ella inciden. El estudio se basó en los resultados de los índices de infección (IIMA) obtenidos para los controles utilizados en los ensayos realizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3.1.1 (página 62) se muestran los parámetros estadísticos descriptivos y en la figura 3.1.1 (página 62) un análisis de frecuencia para los IIMA. Como se desprende del análisis si bien la dispersión es elevada, casi el 50% de los IIMAs se encuentran entre 1,56 y 4,87 (media de 3,21).

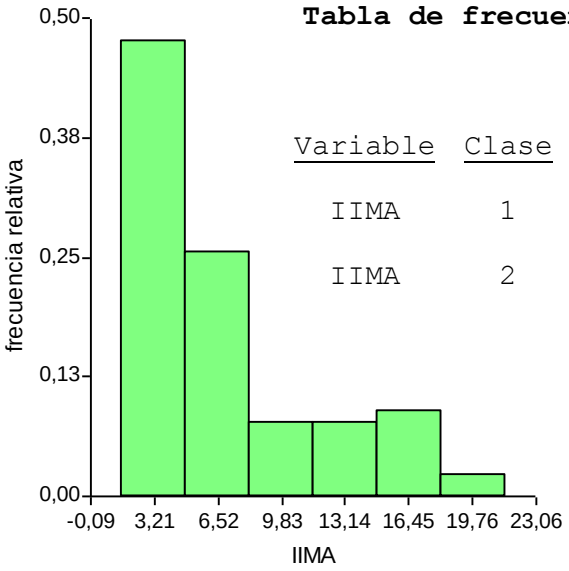

Tabla de frecuencias

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR
IIMA	1	1,56	4,87	3,21	43	0,48
IIMA	2	4,87	8,18	6,52	23	0,26

Figura 3.1.1. Análisis de frecuencia para la variable IIMA de los controles de todos los bioensayos realizados, con su tabla. N = 90. En la tabla se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media (MC), la frecuencia absoluta (FA) y la frecuencia relativa (FR).

Tabla 3.1.1 Estadísticos descriptivos para el índice de infección IIMA obtenido a partir de los controles de la totalidad de los bioensayos realizados.

Estadístico	***Valor del Estadístico***
Media	6.84
Intervalo de confianza para la media al 95%	5.86 - 7.81
Mediana	5.12
Varianza	21.53
Desviación típica	4.64
Mínimo	1.56
Máximo	21.41
Rango	19.85
Amplitud intercuartil	5.26
Asimetría	1.19
Curtosis	0.52
Moda	3.16
N	90

La pregunta que surge a partir de este análisis es ¿Qué factor genera la variabilidad? La gran variabilidad de los resultados obtenidos puede deberse a la incidencia de distintos factores, principalmente: 1) las condiciones bajo las que se llevó a cabo el desarrollo embrionario, 2) el medio de ensayo, y 3) la hembra que realizó la puesta.

1) Las condiciones bajo las que se llevó a cabo el desarrollo embrionario variaron según los huevos se destinaran a los bioensayos con embriones (E) o con larvas (L). (Tabla 3.1.2)

2) El medio de ensayo: Los medios utilizados en los ensayos realizados sobre el desarrollo embrionario y sobre las larvas fueron, agua reconstituida (EPA) y agua del río Sauce Grande (SG).

3) La hembra que realizó la puesta: Los embriones y larvas utilizados en cada ensayo se obtuvieron a partir de una única hembra. La sumatoria de todos los ensayos realizados implicó la participación de huevos y larvas de diferentes hembras, en total, 15 hembras.

Tabla 3.1.2 Condiciones bajo las que se llevó a cabo el desarrollo embrionario de los individuos utilizados en los bioensayos sobre las etapas preparasitarias.

Condiciones	***Bioensayos con Embriones***	**Bioensayos con Larvas**
Volumen del medio	1.5 ml	4 litros
Oxigenación	Manual	Aireadores
Cantidad aproximada de larvas expuestas al hospedador	Muestras con 150 a 300 larvas	Muestras con 2000 larvas

Para encontrar la respuesta a la pregunta planteada se realizaron test estadísticos (prueba de Mann-Whitney, prueba t y prueba de Kruskal-Wallis), a un nivel de significancia de 0.05.

A partir de las figuras 3.1.2 a 3.1.3, se puede inferir que tanto las condiciones bajo las que se llevó a cabo el desarrollo embrionario (Figura 3.1.2, página 64), como el medio de ensayo (Figura 3.1.3, página 64), no generarían variabilidad sobre la capacidad infectiva. En tanto que observando la figura 3.1.4 (página 65) se puede inferir que la variable hembra si generaría variabilidad en la capacidad infectiva. Estas inferencias se confirman luego de realizar las evaluaciones estadísticas (Apéndice II, Tablas 1, 2 y 3, página 131).

De los tres factores de variabilidad considerados, el único que influyó sobre la capacidad infectiva es el factor hembra. Como se ve en la figura 3.1.4 (página 65), las hembras demuestran poseer una gran variabilidad entre ellas, e incluso en algunas se puede observar que la capacidad infectiva de su progenie es variable.

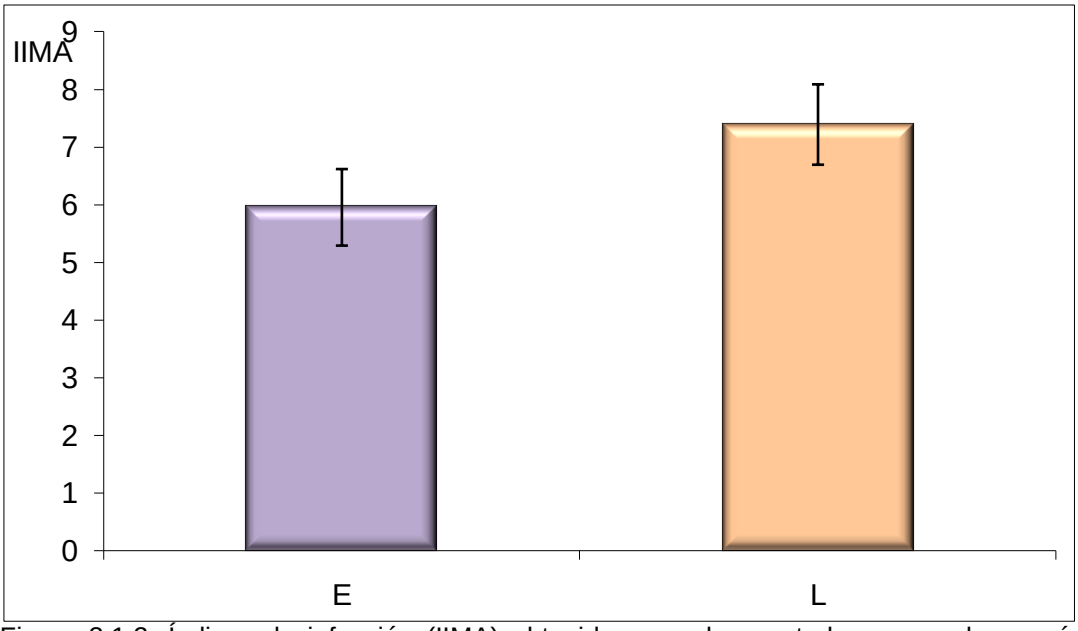

Figura 3.1.2. Índices de infección (IIMA) obtenidos para los controles agrupados según las condiciones del desarrollo embrionario de los ensayos de embriones (E) y larvas (L). Los valores se expresan como media aritmética ± ES.

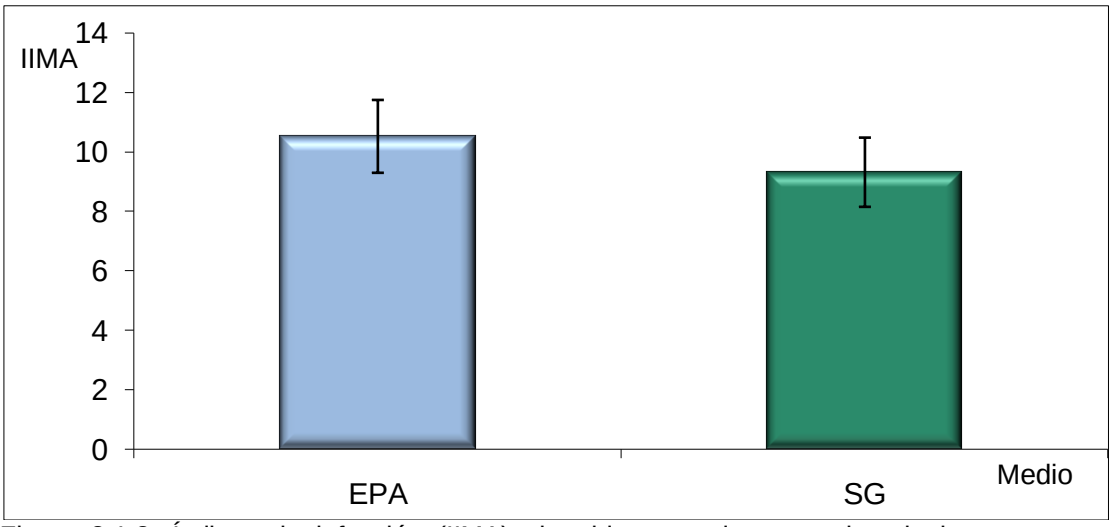

Figura 3.1.3. Índices de infección (IIMA) obtenidos para los controles de los ensayos de desarrollo embrionario y larvas agrupados según el medio de ensayo, agua reconstituida (EPA) y agua del medio natural (SG). Los valores se expresan como media aritmética ± ES.

Estos resultados son los primeros que se dan a conocer sobre la viabilidad de las larvas de *Chordodes nobilii*, y demuestran que la gran variabilidad observada en la capacidad infectiva probablemente se deba a la carga genética de la progenie. En este sentido, es importante considerar que la modalidad de fecundación del grupo, que conlleva a que una misma hembra pueda ser fecundada por varios machos (May, 1919; Camerano 1915; Schmidt-Rhaesa, 1997), repercutiendo de este modo en una mayor variabilidad genética de la progenie.

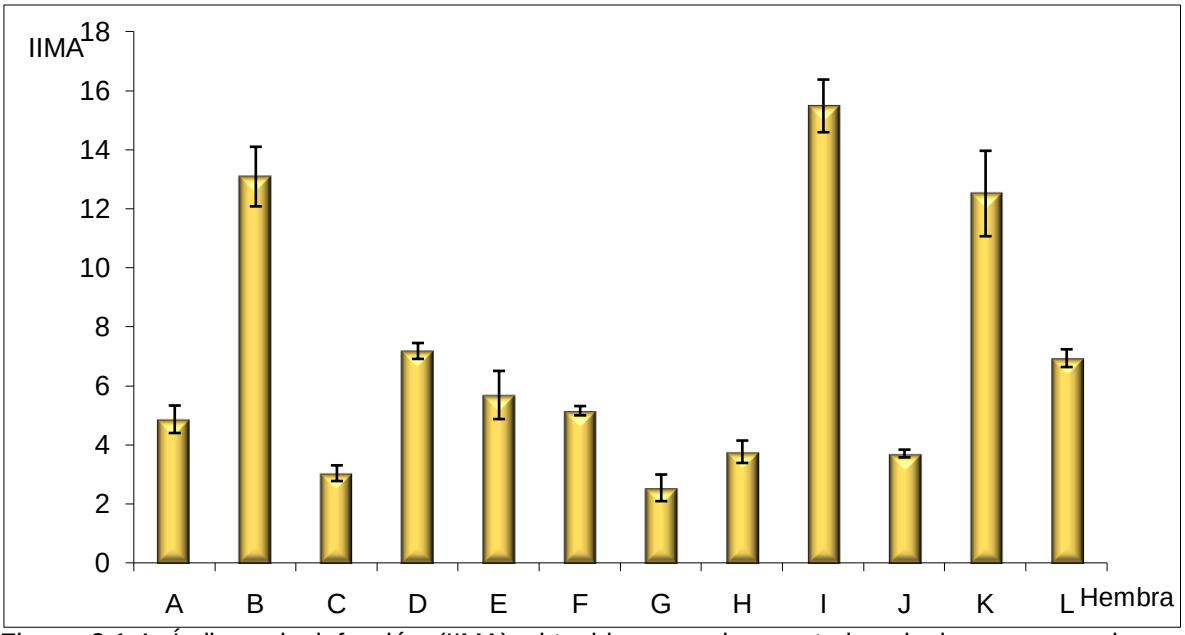

Figura 3.1.4. Índices de infección (IIMA) obtenidos para los controles de los ensayos de desarrollo embrionario y larvas agrupados según la hembra de la cual provenían los huevos. En el eje x se muestran los nombres dados a las hembras. Los valores se expresan como media aritmética ± ES.

Los resultados que se muestran en este capítulo son de gran importancia al momento de realizar las comparaciones entre ensayos. Como la variabilidad de la capacidad infectiva se debe a las hembras, para realizar las comparaciones entre tratamientos de diferentes bioensayos se tomó como modalidad de procedimiento relativizar los valores de los IIMAs a sus respectivos controles.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Chordodes nobilii* A TRES PLAGUICIDAS

INTRODUCCIÓN

En la Argentina, un país primordialmente productor, la frontera agropecuaria continuamente en expansión cubre grandes superficies del territorio. Se estima que para 2016 habrá 35.5 millones de hectáreas cultivadas que permitirán cosechar 116 millones de toneladas de cereales, oleaginosas y cultivos industriales. Si además tenemos en cuenta que en América del Sur el 31% de la cosecha de trigo se pierde a causa del ataque de hongos, insectos, malezas, etc., y que, en el caso de la soja y el maíz las pérdidas alcanzan el 32% y el 44% respectivamente, es previsible que la aplicación de agroquímicos en general, y principalmente los fitosanitarios, aumentará de forma importante en los próximos años (Perez y Anastasio, 2006).

Una definición de plaguicida es la que los considera como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se utiliza para el control de plagas que atacan a los cultivos o que son vectores de enfermedades del hombre (Albert, 1997).

A diferencia de otros contaminantes ambientales los plaguicidas no llegan al ambiente de manera accidental, son usados directamente sobre los agroecosistemas con la intención del control de plagas. El uso de los pesticidas a menudo requiere que su aplicación sea realizada sobre grandes áreas de cultivo, resultando en una exposición de las áreas adyacentes a los mismos (Connell, 1997; Dickson, 1994). Por tanto, existe un riesgo potencial elevado de que los plaguicidas ingresen en los ambientes lindantes a los cultivos tratados, particularmente a los cuerpos de agua dulce, con el consiguiente efecto sobre su biota en general. El ingreso puede realizarse por deposición atmosférica (deposición húmeda de la lluvia y la neblina) luego de una aplicación aérea, como resultado de la dispersión en el aire y de ser transportado por los vientos, incluso a zonas muy alejadas de la región en que se aplicó.

Los plaguicidas también pueden incorporarse a las masas hídricas accidentalmente, por escorrentía superficial debido a las lluvias, así como por infiltración hacia los acuíferos perdedores y desde allí alcanzar los cuerpos de agua superficiales, y asimismo se debe considerar a la erosión, que puede producir arrastres. Es de destacar que la escorrentía es una de las mayores fuentes no puntuales de contaminación de agua por plaguicidas, cuyo efecto se ve incrementado si se considera que en los últimos años el desarrollo de los cultivos extensivos adquirió como práctica la realización de la siembra prácticamente hasta la orilla de los ríos y arroyos. La incorporación de los plaguicidas a las aguas depende ante todo de su solubilidad, y su permanencia en los cuerpos de agua depende de la facilidad de su transformación a metabolitos, que generalmente se produce por hidrólisis, fotólisis o por acción biológica (Bollmohr y Schulz, 2009; Dickson, 1994, Seoánez Calvo, 1996; Vera y col., 2010).

La Cuenca del Sauce Grande es un área predominantemente agrícola ganadera, con pequeños asentamientos urbanos tales como la localidad de Sierra de la Ventana (38º 9’ 0’’ S, 61º 48’ 0’’ W). Las tierras dedicadas a la agricultura cubren un 28% del área total, con cultivos como trigo, avena, girasol, sorgo, maíz y soja; utilizándose insecticidas en un 17% de los campos de cultivo (Aduriz y col., 2003). Varios plaguicidas pueden alcanzar los cuerpos de agua aledaños directa o indirectamente, siendo un riesgo potencial para los organismos acuáticos, incluido *Chordodes nobilii*, que es un integrante habitual de los cuerpos de agua de la zona (de Villalobos y col., 2003).

En los últimos años, se ha generado un grado creciente de preocupación tanto a nivel de los organismos de control y gestión como en la comunidad en general, a causa del uso intensivo de plaguicidas y los efectos adversos en los organismos no blanco. Los efectos de los plaguicidas van a variar según el organismo que se esté estudiando y cual sea la respuesta evaluada. Es fundamental por tanto, conocer el efecto que los plaguicidas pueden tener sobre distintos componentes de la biota acuática que no son normalmente usados en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico, como es el caso de los gordiidos.

Una forma de clasificación de los plaguicidas se basa en el tipo particular de plaga sobre la que actúan. Así, los principales grupos son los herbicidas, insecticidas y fungicidas. Para la realización de esta tesis se eligió un representante de cada clase. Un herbicida, el Glifosato, un insecticida, el Malatión, y un fungicida, el Carbendazim.

GLIFOSATO

El Glifosato (N-fosfonometilglicina, $C_3H_8NO_5P$, CAS 1071-83-6), es un aminofosfonato, análogo del aminoácido natural glicina, ampliamente utilizado en la agricultura y en la silvicultura en todo el mundo para controlar la maleza, y también en actividades no agrícolas. Es un herbicida no selectivo y de acción post-emergente que inhibe a la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), responsable de la síntesis proteica de los aminoácidos aromáticos esenciales fenilalanina, tirosina y triptófano; también puede inhibir o reprimir la acción de otras dos enzimas involucradas en otros pasos de la síntesis de los mismos aminoácidos, la clorismato mutasa y la prefrenato hidratasa. Por tanto reduce la síntesis de proteínas y el crecimiento, eventualmente causando la disrupción celular y la muerte. Las enzimas mencionadas forman parte de la vía del ácido chiquímico, presente en plantas superiores y microorganismos, pero no en animales, ya que carecen de este proceso bioquímico (Baylis, 2000; Battaglin y col., 2005; Solomon y Thompson, 2003; Vera y col., 2010; Williams y col., 2000). El tiempo de vida media en agua es de 7–70 días, su solubilidad es de 10 a 15.70 mg/L a 25ºC (Battaglin y col., 2005; Relyea, 2005).

Existe una amplia gama de diferentes formulaciones de Glifosato que se han registrado y vendido. Siendo un ácido, el ingrediente activo en los productos de Glifosato puede ser formulado como sales o esteres, esto le da a este herbicida una tremenda flexibilidad (Baylis, 2000).

Actualmente los productos usados comúnmente son las formulaciones de Glifosato (ej., Accord®, AquaMaster™, Rodeo®, Rondo®, Roundup®, Touchdown®), en las fórmulas del herbicida, el glifosato es el principio o ingrediente activo, al que se le adiciona agua y un surfactante que le permite al producto adherirse a la superficie de las hojas y así el ingrediente activo puede penetrar en los tejidos de las plantas, y por lo tanto, produce un efecto toxicológico diferente al del glifosato solo. Debido a esto, la mayoría de los estudios llevados a cabo para comprender los efectos del glifosato en ambientes acuáticos se han realizado usando formulaciones de glifosato. Entre estas formulaciones comerciales, una de las más usadas en el mundo es Roundup®, que contiene 480 g/L de glifosato, como sal de isopropiloamina, y un surfactante, polyoxyehylene amina o POEA (Baylis, 2000, Vera y col., 2010).

Desde la introducción de Roundup® por Monsanto en la década de 1970, el glifosato, en su variedad de sales y formulaciones ha transformado la agricultura global. Desde 1996, con el inicio de la comercialización de la soja resistente al herbicida

'Glifosato' (nombre comercial 'RoundUp®', Rodeo) o soja RR (por Round-Up Ready) la aplicación de herbicidas en base al glifosato aumentaron en las zonas donde se cultiva tanto esta variedad de soja como también otros cultivos transgénicos. En Argentina, el área plantada con soja se incrementó de 370000 hectáreas (ha) en 1996 a 17 millones de ha en la actualidad (casi el 50% del área total plantada en el país), siendo más del 98% de la soja cultivada tolerante al glifosato. Por tanto, esta variedad de soja modificada genéticamente, es el cultivo más importante en Argentina y transformó a nuestro país en el segundo productor de soja más grande en el mundo (después de EEUU). Por otra parte, el glifosato se utiliza no sólo para la soja, sino también para otros cultivos como maíz, algodón y canola, y para el barbecho químico. Esta práctica agrícola es un control de malezas mediada por el herbicida, para conservar el contenido de agua del suelo que será utilizado por diferentes cultivos en la rotación. Estas circunstancias llevaron a la Argentina a utilizar 162 millones kg de glifosato en 2007 (Baylis, 2000; Zabaloy y col., 2008; Vera y col., 2010). En Sierra de la Ventana (Buenos Aires), el glifosato es uno de los herbicidas más ampliamente utilizados (INTA, 2003).

En relación al ambiente acuático el Glifosato tiene un tiempo de vida media en agua de 7–14 días, siendo su solubilidad de 10 a 15.70 mg/L a 25ºC (Battaglin y col., 2005; Relyea, 2005).

Existe abundante información sobre los efectos del Glifosato y sus formulaciones sobre diferentes organismos acuáticos reportándose un grado de toxicidad muy amplio, siendo generalmente el formulado más tóxico que el ingrediente activo (Antón y col., 1994; Buhl y Faerber, 1989; Folmar, y col.,1979; Hildebrand, y col.,1982; Kovacs,1982; Servizi y col., 1987; Tsui y Chu, 2003; Tsui y col., 2005).

CARBENDAZIM

El metil benzimidazol-2-ylcarbamato (IUPAC) conocido como Carbendazim ($C_9H_9N_3O_2$), cuyo número de CAS es 10605-21-7, es un carbamato benzimidazol que actúa como fungicida con actividad sistémica, utilizado mundialmente. Benzimidazoles como el Carbendazim son aplicados ampliamente en la agricultura y en medicina veterinaria como fungicidas y como drogas antihelmínticas. En los hongos actúa inhibiendo el desarrollo de los tubos germinales, la formación de apresorios, y el crecimiento de los micelos. Es un inhibidor de la división nuclear (inhibe la formación del huso mitótico) y un inhibidor transitorio de la enzima acetilcolinesterasa (Álvarez y col.,

2006, Cuppen y col., 2000; Dang y Smit, 2008; Gonzáles, 2004; Kirsch-Volders, 2003), y también es considerado como un posible disruptor endocrino (Varela bruce, 2005).

Dentro de los plaguicidas el Carbendazim se clasifica en la categoría de biocidas, (Brock y col., 2006) y es uno de los más usados como película preservativa, también es uno de los compuestos más importantes usados para recubrimientos de interior, además de ser conservante para el cuero (Kupper y col., 2005).

Varela bruce (2005) cita que los resultados de la aplicación del modelo de fugacidad evidencian la presencia de Carbendazim en cuencas chilenas a concentraciones estimadas de 0,42 a 0,79 µg/l. Además este autor considera que el Carbendazim es un pesticida potencialmente riesgoso para el ambiente si se consideran parámetros tales como, toxicidad aguda en peces, persistencia en el ambiente (120 días), y carga de pesticida que difunde hacia las cuencas. En el reporte de Dang y Smit (2008) se informa que para la hidrólisis la tasa de degradación media del Carbendazim es pH dependiente, siendo estable a un pH de 5.7, y con una TD_{50} entre 22 y 124 días a pH 9; en tanto que para la fotólisis este fungicida sería estable.

En Argentina se recomienda el uso de Carbendazim para enfermedades fúngicas del trigo, plantas frutales, verduras, y también es utilizado en la floricultura (INTA: Gamboa, 1999; Fernández, 2002; Mitidieri, 2005; Babbitt y col., 2006; Paunero, 2007). A partir del año 2001, junto con el incremento en el área sembrada, se lo ubica entre los principios activos de mayor consumo para el cultivo del trigo (Pérez Leiva y Anastasio, 2006), siendo utilizado con alta frecuencia en el noreste de la zona pampeana (INTA: Babbitt y col., 2006).

Finalmente debe contemplarse que la información sobre la toxicidad del Carbendazim sobre organismos dulceacuícolas es escasa, ya que los taxa susceptibles a fungicidas pueden no estar adecuadamente representados entre las especies acuáticas estándar utilizadas en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico (Van den Brink y col., 2000).

MALATION

El Malatión (0,0-dimetil fosforo-ditioato de dietil mercapto succinato) cuyo número de CAS es 121-75-5, es un insecticida organofosforado, entre los más usados en Europa (Aluigi y col., 2005), clasificado por la EPA dentro de los pesticidas de clase de toxicidad III, y como un pesticida de uso general. Es ampliamente usado porque se lo considera relativamente poco tóxico para mamíferos y tiene alta selectividad para insectos

comparado con otros insecticidas organofosforados (Pandey y col., 2005). El malatión es específicamente tóxico para invertebrados porque ellos no son capaces de metabolizar y excretar el Malatión tan rápidamente como los vertebrados. En insectos, los organofosforados actúan inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (AChE), pero también alteran el metabolismo de proteínas y carbohidratos, incrementando así su letalidad (Cook y col., 2005). El Malatión es utilizado como control de insectos en la agricultura, en productos almacenados, en campos de golf, en jardines y en sitios al aire libre; es utilizado contra mosquitos y las moscas de la fruta del Mediterráneo en grandes áreas al aire libre. Además, es utilizado contra pulgas de animales domésticos y contra los piojos en humanos. Por lo general se aplica rociándolo desde aviones sobre los cultivos, pudiendo ser liberado sobre superficies de agua por aplicación directa (ATSDR, 2003). En Argentina, desde el 2008 se prohibió el uso de determinados principios activos en formulaciones de productos domisanitarios, entre ellos el Malatión (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2008), pero este sigue siendo un plaguicida usado en la actividad agrícola en el país (www.inta.gov.ar).

El Malatión en el agua usualmente sufre degradación química y microbiana en relativamente poco tiempo, pero puede permanecer en el ambiente por meses. El índice y alcance de su degradación depende de las características químicas y físicas del sistema acuático, particularmente la temperatura y el pH, y de la composición de la población microbiana presente en el sistema. El Malatión es rápidamente degradado en soluciones a pH de 9 y 7.7, con vidas medias de 12-24 horas y 3 días respectivamente (ATSDR, 2003). Cook y col., (2005) reportaron que la vida media del Malatión en cuerpos de agua dulce fue de 12 días y que era indetectable a las 4 semanas luego de haber sido liberado experimentalmente en el ambiente acuático.

La toxicidad del Malatión sobre diferentes organismos acuáticos ha sido estudiada por varios autores, entre los que podemos citar a Bonfanti y col., 2004; Budischak y col., 2008; Cripe, 1994; Key y col., 1998; Key y Fulton, 2006; Khangarot y Ray, 1988; Lund y col., 2000; Pandey y col., 2005; Pathiratnea y George, 1998; Tsuda y col., 1997.

El **objetivo** de este capítulo es evaluar la sensibilidad de *Chordodes nobilii* a, Glifosato, Carbendazim y Malatión, en condiciones estandarizadas de laboratorio.

En el capítulo II, de la sección II, se describió el protocolo seguido con los estadios de vida libre y las características particulares para los bioensayos con tóxicos (página 49 y

54). En la tabla 2.2.1 (página 56) se muestran los parámetros considerados en estos bioensayos, en las Tablas 2.2.2 y 2.2.3 (página 57) se muestran las concentraciones nominales de los plaguicidas utilizadas y, en la tabla 3.2.1 se expresan las concentraciones efectivas evaluadas para Glifosato (Gli), Carbendazim (Car) y Malatión (Mal) en los ensayos realizados con los estadios preparasitarios. Para adultos solamente se evaluó el efecto del Glifosato como formulado en la concentración efectiva de 1.76 mg Gli e.a./L.

Tabla 3.2.1. Concentraciones efectivas de los plaguicidas evaluados en los bioensayos de desarrollo embrionario y larvas con agua reconstituida, expresadas en mg/L. En el caso del Glifosato tanto para el bioensayo con ingrediente activo (i.a.), como para el de formulado (F.), la concentración se expresa como mg de equivalente ácido (e.a.) por litro.

Concentraciones efectivas evaluadas (mg/L)				
Glifosato i.a.	**Glifosato F.**	**Carbendazim**		**Malatión**
Embriones y Larvas		**Embriones**	**Larvas**	**Embriones y Larvas**
0	0	0	0	0
0.08	0,07	0.01	0.01	0.04
0.42	0,37	0.02	0.02	0.05
0.84	0,74	0.04	0.04	0.07
1.68	1,48	0.09	0.07	0.11
3.36	2,96	0.18	0.15	0.22
6.73	5,93	0.36	0.30	-

Las concentraciones efectivas fueron determinadas en valores no mayores al 12% respecto de la concentración nominal, para cada tratamiento. En los gráficos, a fines comparativos, se utilizan las concentraciones nominales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos simularon una exposición puntual a los plaguicidas. n el caso del desarrollo embrionario, las 96 horas de exposición corresponden aproximadamente a un 15% solamente del tiempo necesario para que alcancen el estadio de larvas libres. Es importante de destacar que el tiempo de exposición utilizado en esta Tesis en todos los bioensayos fue menor o igual que el tiempo de vida medio de los plaguicidas en el agua (Tabla 3.2.7., página 82; Cuppen y col. 2000; Daam y col., 2009; Giesy y col., 2000; Varela Bruce, 2005), por lo que se asume que los plaguicidas fueron persistentes durante el tiempo de exposición.

Parte de los resultados obtenidos en los diferentes análisis realizados se muestran en el Apéndice II, donde se exponen las tablas con estadísticos según tratamientos, las tablas obtenidas de las comparaciones de Tuckey realizadas a posteriori del ANOVA y los resultados del análisis de regresión. En la tabla 3.2.3 se muestran las CI_{50} obtenida para cada pesticida (página 76).

EMBRIONES

Ninguno de los tres plaguicidas evaluados inhibió el desarrollo embrionario (Apéndice II, Tablas 4 – 8, páginas 132 - 133). Aunque, en el caso de Malatión, hubo un aumento significativo de los embriones no viables respecto del control para la máxima concentración ensayada (0.22 mg Mal/L) (Apéndice II, Tablas 7 y 8, página 133, Figura 3.2.1).

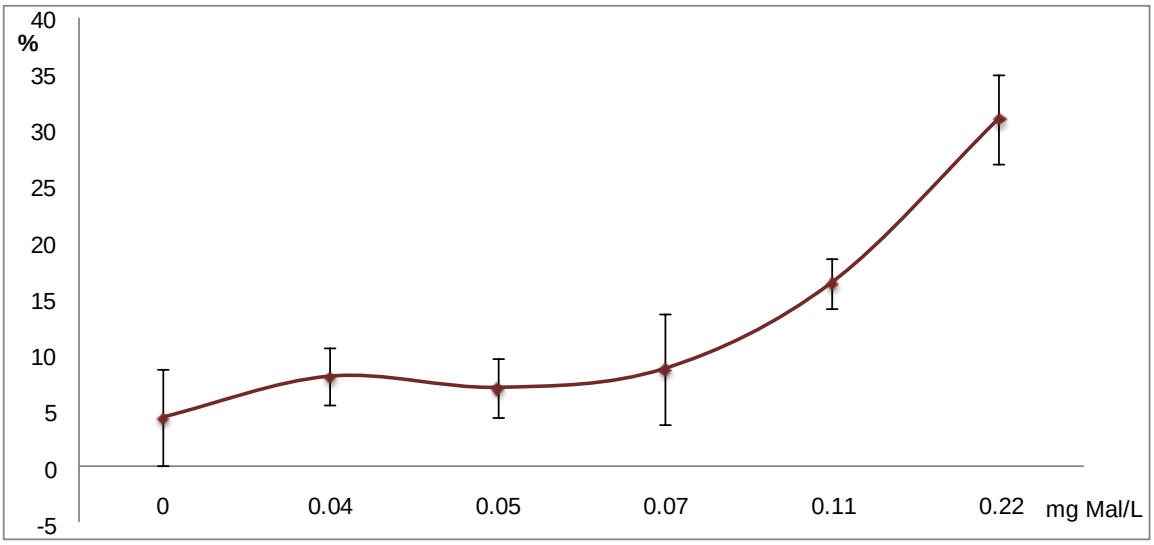

Figura 3.2.1. ENV (Embriones No Viables) expresados como porcentaje, obtenidos luego de exponer los huevos a Malatión utilizando como medio de dilución agua reconstituida. Se grafica la media de los Embriones No Viables (ENV) ± ES. Las concentraciones de Malatión se expresan como valores analíticos.

Los tres plaguicidas determinaron que la proporción de larvas normales eclosionadas de los huevos expuestos estuviera significativamente disminuida respecto del control. Este efecto se reflejó en la capacidad infectiva de las larvas que lograron eclosionar de los huevos expuestos, aún a las menores concentraciones ensayadas, 0.08 mg Gli i.a./L, 0.07 mg Gli F./L, para Glifosato como ingrediente activo y como formulado respectivamente, 0.01 mg Car/L y 0.04 mg Mal/L (Figuras 3.2.2 – 3.2.4, Apéndice II, Tablas 10, 12, 14 y 16, páginas 168 - 170). Para Malatión se observaron malformaciones

en las larvas provenientes de los embriones expuestos a 0.22 mg Mal/L, que se discuten más adelante (Figura 3.2.5, página 81).

Salvo para el Glifosato como formulado, los plaguicidas generaron un efecto concentración dependiente sobre la capacidad infectiva de las larvas eclosionadas de huevos expuestos (Apéndice II, Tabla 68, página 152) con valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) en mg/L, entre 0.054 (Gli F) y 0.007 (Car) (Tabla 3.2.3, página 76). Estos resultados permiten establecer el siguiente orden decreciente de toxicidad sobre el desarrollo embrionario Carbendazim > Malatión > Glifosato F≅ Glifosato i.a.

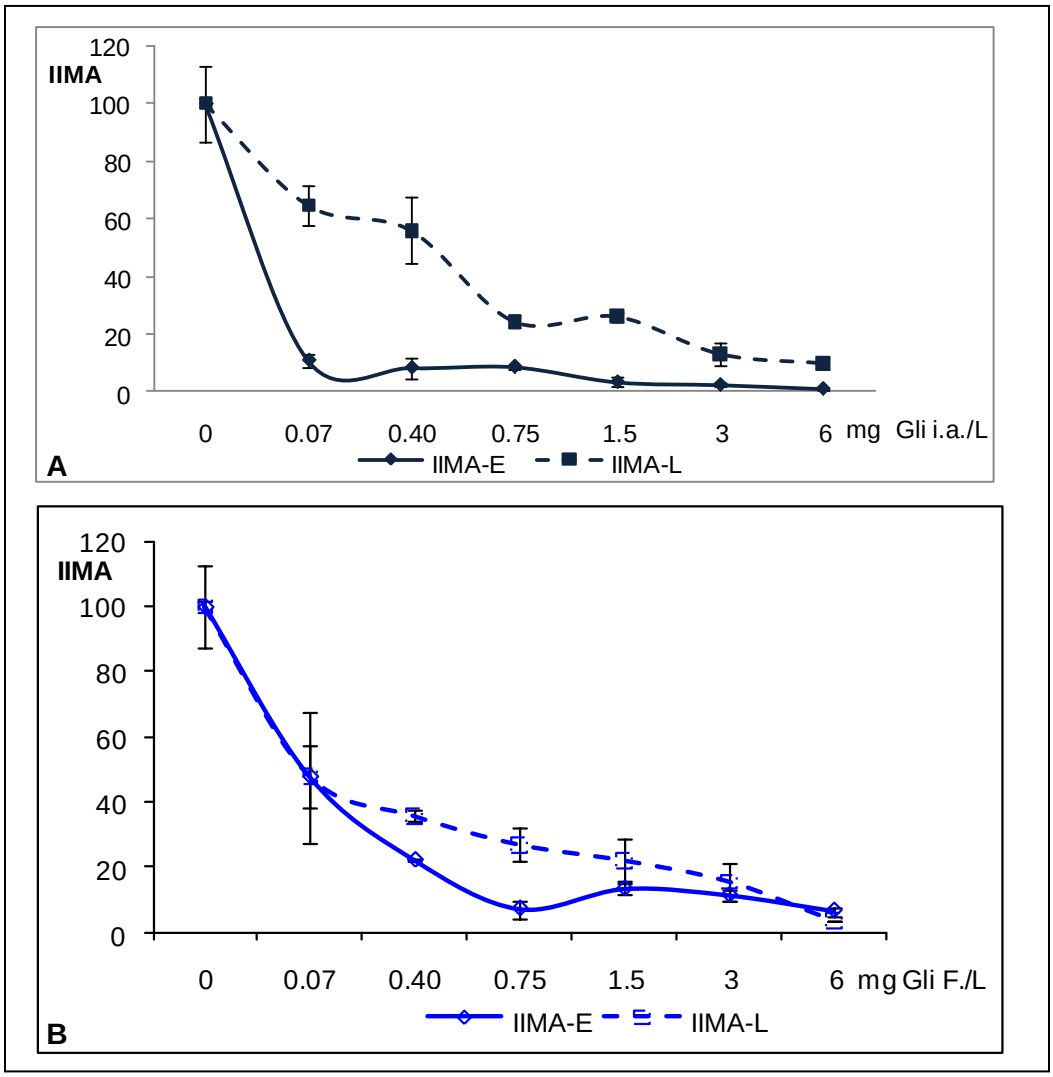

Figura 3.2.2. Efecto del Glifosato (Gli) en los estadios preparasitarios embriones (E.) y larvas (L.). Se grafica el IIMA expresado como porcentaje referido al control respectivo. Valores expresados como media aritmética ± ES, por tratamiento. A) como ingrediente activo (i.a.); B) como formulado (F).

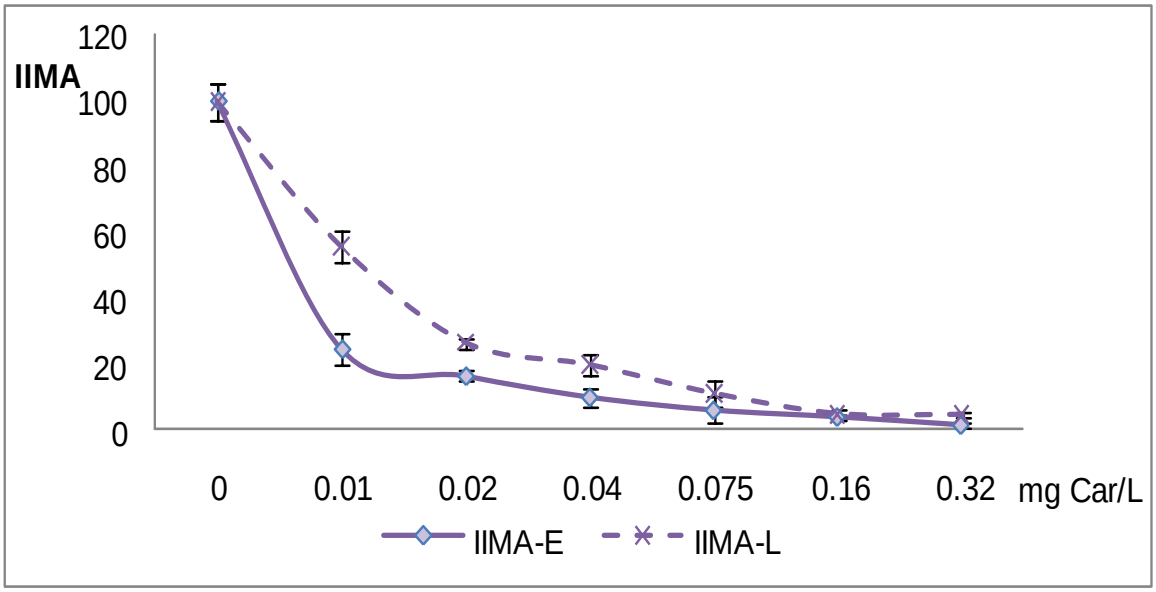

Figura 3.2.3. Efecto del Carbendazim (Car) en los estadios preparasitarios embriones (E.) y larvas (L.). Se grafica el IIMA expresado como porcentaje referido al control respectivo. Valores expresados como media aritmética ± ES, por tratamiento

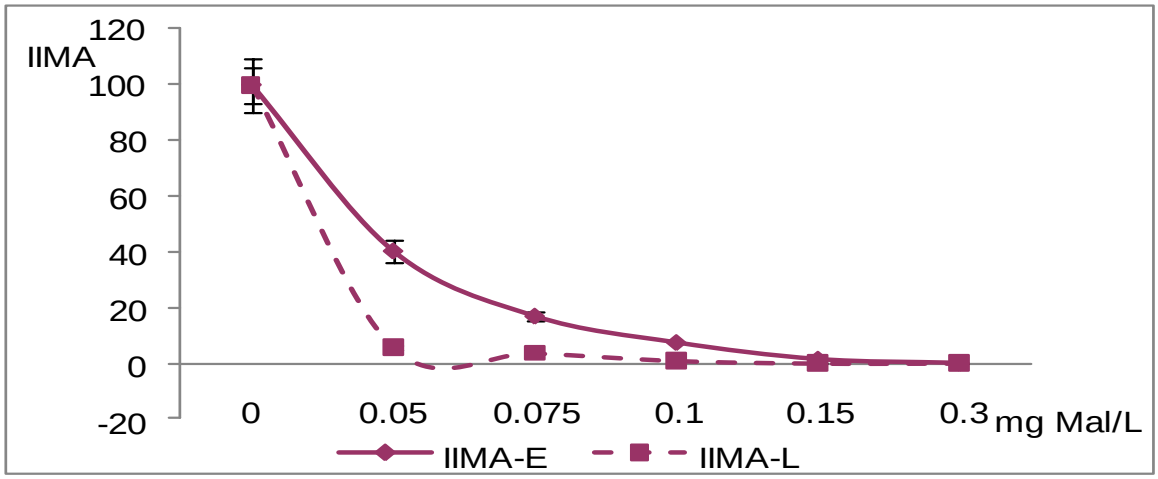

Figura 3.2.4. Efecto del Carbendazim (Car) en los estadios preparasitarios embriones (E.) y larvas (L.). Se grafica el IIMA expresado como porcentaje referido al control respectivo. Valores expresados como media aritmética ± ES, por tratamiento

LARVAS

Para larvas (Figuras 3.2.2 – 3.2.4), los resultados fueron similares, los tres plaguicidas afectaron la supervivencia larval desde la menor concentración ensayada de manera significativa respecto de su control (Apéndice II, Tablas 17- 24, páginas 136 - 138), ejerciéndose en todos los casos un efecto concentración dependiente (Apéndice II, Tabla 68, página 152).

De lo expuesto hasta el momento se puede prever que los embriones son tanto o más sensibles que las larvas al Glifosato (como formulado) y al Carbendazim (Figura 3.2.2 B y 3.2.3). En tanto que las larvas serían más resistentes al Glifosato como ingrediente activo (figura 3.2.2 A) y los embriones resultarían más resistentes al Malatión (figura 3.2.4). Cuando se consideran las CI_{50} (Tabla 3.2.3, página 76), las inferencias se confirman en todos los casos.

ADULTOS

La exposición de los adultos a una concentración de 1.76 mg Gli e.a/L como formulado durante 96 hs produjo una mortalidad que alcanzó el 50%, con una media de 2.5 y un desvío estándar de 1.291 (n=4). En el grupo control no se observó mortalidad. Estos resultados confirman un aumento notable de la resistencia de los adultos en relación a las larvas. Si bien hasta el momento no hay más información de toxicidad en adultos es previsible que el modo de vida y anatomía de estos animales (en especial la cutícula) determinen que los mismos puedan sobrevivir en condiciones desfavorables para los estadíos preparasitarios.

La información disponible en la literatura acerca de los niveles de toxicidad del Glifosato para la fauna acuática es variable (Tabla 3.2.4., página 77). Giesy y col. (2000), realizaron una extensa revisión acerca de la ecotoxicidad del glifosato, informando para invertebrados de agua dulce valores de NOEC entre 560 y 0.32 mg/L como e.a. y POEA respectivamente, en ambos casos para *Daphnia magna*. La toxicidad aguda de los invertebrados acuáticos al Roundup establece que este plaguicida sea considerado como no tóxico a moderadamente tóxico (Giesy y col., 2000). Los resultados obtenidos para los adultos de *C. nobilii* muestran que estos pueden clasificarse como moderadamente sensibles al Glifosato.

Tabla 3.2.3. CI_{50}: Concentración Inhibitoria obtenida para los plaguicidas evaluados.

Tóxico	Punto Final	CI_{50} mg/L
Glifosato IA	IIMA-E	0.045
	IIMA-L	0.501
Glifosato F	IIMA-E	0.054
	IIMA-L	0.067
Carbendazim	IIMA-E	0.007
	IIMA-L	0.011
Malation	IIMA-E	0.030
	IIMA-L	0.019

Tabla 3.2.4. Sensibilidad de distintos organismos al Glifosato. Concentraciones expresadas como equivalente ácido (e.a.) o como sal de isopropilamina (sia). Se muestran las concentraciones efectivas medias (CE_{50}) y las concentraciones letales medias (CL_{50}); los puntos finales se citan de acuerdo a la referencia correspondiente.

Organismos Evaluados	***Punto Final***	***Concentración (mg/L)***	***Exposición (horas)***	***Referencias***
Chironomus plumosus	CE_{50}	55 sia (Técnico)	48	Folmar y col., 1979
Pimephales promelas	CL_{50}	97 sia (Técnico)	96	Folmar y col., 1979
Ictalurus punctatus	CL_{50}	130 sia (Técnico)	96	Folmar y col., 1979
Oncorhynchus mykiss	CL_{50}	140 sia (Técnico)	96	Folmar y col., 1979
Lepomis macrochirus	CL_{50}	140 sia (Técnico)	96	Folmar y col., 1979
Hyalella azteca		1.5 e.a		Tsui y Chu, 2004
Lampsilis siliquoidea	CE_{50}	2.90 e.a	48	USEPA ECOTOX
Dhapnia dubia		5.7 e.a		Tsui y Chu, 2004
L. siliquoidea	CE_{50}	5.90 e.a	96	USEPA ECOTOX
L. siliquoidea	CE_{50}	7.20 e.a	96	USEPA ECOTOX
L. siliquoidea	CE_{50}	200 e.a	48	USEPA ECOTOX
L. siliquoidea	CE_{50}	200 e.a	96	USEPA ECOTOX
D. magna	CE_{50}-CL_{50}	780 e.a	2	Giesy y col., 2000
D. magna	CE_{50}	3 sia	48	Folmar y col., 1979
C.plumosus	CE_{50}	18 sia	48	Folmar y col., 1979
C. riparius	CE_{50}	5900	48	Buhl y Faerber, 1989
D. magna	CL_{50}	1.75 sia	96	USEPA ECOTOX
P. promelas	CL_{50}	2.3 sia	96	Folmar y col., 1979
D. magna	CL_{50}	3.29 sia	96	USEPA ECOTOX
L. macrochirus	CL_{50}	5.0 sia	96	Folmar y col., 1979
O. mykiss	CL_{50}	8.3 sia	96	Folmar y col., 1979
I. punctatus	CL_{50}	13 sia	96	Folmar y col., 1979
Gammarus pseudolimnaeus	CL_{50}	43 sia	96	Folmar y col., 1979
G. pseudolimnaeus	CL_{50}	62 sia	48	Folmar y col., 1979

En particular el efecto del glifosato sobre el Phylum Nematoda fue evaluado por Forschler y col. (1989), quienes indican que las larvas dauer de *Steinernema feltiae* disminuían la actividad entre un 20% y un 25% a concentraciones de Glifosato entre 0.4 a 40 mg/L Roundup EC respectivamente. Las larvas de *S. feltiae* recobraron su capacidad infectiva una vez que se encontraron en medio limpio, en tanto que las larvas expuestas de *C. nobilii*, disminuyeron su capacidad infectiva en 50% o más respecto del control desde la menor concentración ensayada.

Generalmente en la bibliografía se encuentra que el formulado de Glifosato resulta más tóxico para los organismos evaluados que el ingrediente activo (Folmar y col., 1979, Tsui y Chu, 2003). Los resultados de esta Tesis permiten determinar que, para el estadio

embrionario de *C. nobilii*, el Glifosato como ingrediente activo (CI_{50} de 0.045 mg/L) puede ser tan tóxico como el formulado (CI_{50} de 0.054 mg/L).

En la Tabla 3.2.5, se muestran algunos resultados obtenidos de la literatura en relación al efecto del Carbendazim sobre la biota acuática. Se puede apreciar que las especies estandarizadas para los ensayos de riesgo ecotoxicológico como *Daphnia magna* y *Onchorhynchus mykiss* serían las menos sensibles al Carbendazim.

Tabla 3.2.5. Sensibilidad de distintos organismos al Carbendazim. Se muestran resultados sobre la concentración efectiva media (CE_{50}) y la concentración letal media (CL_{50}); los puntos finales se citan de acuerdo ala referencia correspondiente.

Especie	***Punto final***	***Concentración (mg/L)***	***Exposición (hs)***	***Referencias***
Caenorhabditis elegans	CE_{50}	0.000382 a 0.000681	-	Jonker y col., 2004
Dugesia lugubris	CE_{50}	0.025	96	van Wijngaarden y col., 1998
Daphnia magna	CE_{50}	0.097	24	Ferreira y col., 2008
Dugesia lugubris	CE_{50}	0.178	48	van Wijngaarden y col., 1998
Daphnia magna	CE_{50}	0.391	48	Brock y col., 2006
Onchorhynchus mykiss	CL_{50}-CE_{50}	0.431	-	Brock y col., 2006
Daphnia magna	CL_{50}-CE_{50}	0.460	-	Canton, 1976, FIDE Cuppen y col., 2000
Ictalurus punctatus	CL_{50}	0.007	-	Palawski y Knowles, 1986
Ictalurus punctatus	CL_{50}	0.012	-	Palawski y Knowles, 1986
Ictalurus punctatus	CL_{50}	0.010	-	Palawski y Knowles, 1986
Ictalurus punctatus	CL_{50}	0.019	-	Palawski y Knowles, 1986
Daphnia magna	CL_{50}	0.0282	48	USEPA ECOTOX
Daphnia magna	CL_{50}	0.103	48	USEPA ECOTOX
Salmo agirdneri	CL_{50}	0.145	-	Palawski y Knowles, 1986
Daphnia magna	CL_{50}	0.156	48	Ferreira y col., 2008
Daphnia magna	CL_{50}	0.156	48	USEPA ECOTOX
Salmo agirdneri	CL_{50}	0.320	-	Palawski y Knowles, 1986
Salmo agirdneri	CL_{50}	0.370	-	Palawski y Knowles, 1986
Salmo agirdneri	CL_{50}	0.870	-	Palawski y Knowles, 1986
Dero digitata	CL_{50}	0.980	48	van Wijngaarden y col., 1998

Tabla 3.2.5 (Continuación)

Galaxias maculatus	CL_{50}	18.9	96	Varela bruce, 2005
Lepomis macrochirus	CL_{50}	>3.2	-	Palawski y Knowles, 1986

Cuppen y col. (2000), realizaron experimentos en microcosmos y encontraron que grupos taxonómicos tales como Turbellaria, Oligochaeta, e Hirudinea, junto con el anfípodo *Gammarus pulex* y el caracol *Bithynia tentaculata*, fueron los organismos más sensibles de su estudio.

Considerando la información de la literatura y las CI_{50} obtenidas para los estadios preparasitarios de *Chordodes nobilii* (CI_{50}-96h 0.0074 mg/L para embriones y la CI_{50}-48h de 0.011 mg/L para larvas), podemos inferir que los grupos taxonómicos “Turbellaria”, Oligochaeta, Hirudinea, Nematoda, junto con Nematomorpha, se encontrarían entre los organismos no blanco más sensibles a este fungicida.

La información existente acerca de la toxicidad del Malatión sobre diferentes organismos muestra un rango amplio de efecto (Tabla 3.2.6).

Tabla 3.2.6. Sensibilidad de distintos organismos al Malatión. Se muestran resultados sobre la concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC, siglas en inglés) y la concentración letal media (CL_{50})

Especie	***Punto final***	***Concentración (mg/L)***	***Exposición (hs)***	***Referencias***
Palaemonetes pugio	LOEC	0.00375	96	Key y Fulton, 2006
P. pugio	LOEC	0.0125	96	Key y Fulton, 2006
P. pugio	LOEC	0.025	96	Key y Fulton, 2006
Rana boylii	CL_{50}	2.14	96	Sparling y Fellers, 2007
Daphnia magna	CL_{50}	0.0009	48	ECOTOX
Gammarus fasciatus	CL_{50}	0.00076	96	Johnson y Finley, 1980
Anfípodos	CL_{50}	0.00126 a 0.00229		Leight y Van Dolah, 1999
Tigriopus brevicornis	CL_{50}	0.0072		Forget y col., 1998
Chironomus plumosus	CL_{50}	0.0084	96	ECOTOX
P. pugio	CL_{50}	0.00894	96	Key y Fulton, 2006
C. plumosus	CL_{50}	0.01225	96	ECOTOX
P. pugio	CL_{50}	0.01326	96	Key y Fulton, 2006
T. brevicornis	CL_{50}	0.0205		Forget y col., 1998

Tabla 3.2.6 (Continuación)

T. brevicornis	CL_{50}	0.0243		Forget y col., 1998
P. pugio	CL_{50}	0.03992	96	Key y Fulton
C. plumosus	CL_{50}	0.1024	96	ECOTOX
C. plumosus	CL_{50}	0.262	96	ECOTOX
Juveniles y postlarvas de especies de crustáceos estuariales	CL_{50}	0.0054 a 0.083		Cripe, 1994

Entre los vertebrados, existe mucha variabilidad sobre su sensibilidad al Malatión. Son abundantes los registros de las malformaciones que ocurren luego de la exposición de embriones. Entre ellos se puede mencionar los datos obtenidos por Bonfanti y col., (2004), quienes encontraron que el Malatión no inhibió el desarrollo en las blástulas de *Xenopus laevis*, entre 0.37 y 6 mg/L, pero si se encontraron malformaciones. El índice de eclosión del pez cebra (*Danio rerio*), luego de que los huevos estuvieron expuestos entre 0.25, y 2 mg Malatión /L, fue del orden del 100% , pero se observaron malformaciones en todas las concentraciones evaluadas (Fraysse y col., 2006). En tanto que Cook y col. (2005), expusieron embriones de *Danio rerio* a concentraciones entre 0.5 y 3 mg/l, y encontraron malformaciones a concentraciones iguales o mayores que 2.5 mg/l, y también encontraron que el porcentaje de eclosión se redujo a concentraciones mayores que 2 mg/L.

En las larvas de *C. nobilii* eclosionadas de huevos expuestos también se observaron malformaciones (Figura 3.2.5), que principalmente se manifestaban como una disminución en el tamaño de la larva libre respecto de una larva en el control. También se pudieron observar modificaciones en la anatomía larval, como por ejemplo, que los anillos, los estiletes y ganchos del preseptum no se distinguieron. Esto último es de gran importancia, ya que si la larva no los desarrolla le será imposible atravesar los tejidos del hospedador para alcanzar el hemocele, siendo por tanto inviable. Las malformaciones se observaron en concentraciones que se encontraban en el mismo orden de magnitud que las menores en las que Bonfanti y col., (2004), Fraysse y col., (2006) y Cook y col., (2005), hallaron en sus especies de estudio.

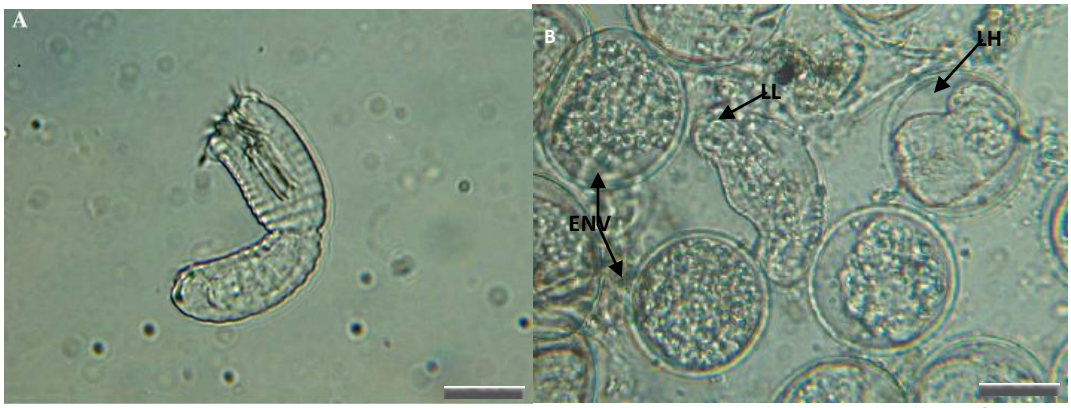

Figura 3.2.5. Larvas eclosionadas de huevos, A) del control; B) expuestos a Malatión, donde además se observan huevos dañados y larva en huevo anormal. LL, larva libre, anormal; ENV, embriones no viables, LH, larva e n huevo, anormal. La barra de escala es igual a 15 µm

En esta Tesis se pudo determinar que la sensibilidad de los estadios preparasitarios de *C. nobilii* al Malatión fue mucho menor que la encontrada para varios crustáceos (Tabla 3.2.6., página 79). Comparando el resultado obtenido para las larvas de *C. nobilii* expuestas al Malatión (CI_{50}-48h de 0.02 mg/L), con la información disponible en la literatura podemos afirmar que son más sensibles que las larvas del díptero *Simulium vittatum* (Simuliidae), para quien se determinó una CL_{50}-96h de 0.05 mg/L (Overmyer y col., 2003), y que vive en hábitats similares a los de *C. nobilii*, ya que se las encuentra comúnmente sobre rocas y otros substratos en arroyos y ríos.

Si se considera el efecto del Malatión sobre la interacción hospedador-parásito, se puede mencionar el trabajo de Budischak y col. (2008), quienes expusieron embriones de *Rana palustris*, a tres concentraciones de Malatión que pueden encontrarse en el ambiente (0.015, 0.060 y 0.60 mg/l), las que se encuentran en el mismo orden a las utilizadas en esta Tesis. Los autores encontraron que tanto la frecuencia de malformaciones, como la eclosión y viabilidad disminuyeron con el incremento de las concentraciones de Malatión. También observaron que los renacuajos expuestos a partir de 0.06 mg/L fueron más susceptibles a la infección de trematodes, lo que se reflejó en un incremento significativo de la frecuencia de quistes. Estos resultados y los obtenidos en esta Tesis sugieren que el Malatión afecta las interacciones hospedador-parásito. Los renacuajos de *Rana palustris* expuestos al Malatión durante el desarrollo embrionario mostraron un incremento en la susceptibilidad a los parásitos junto con el incremento de las concentraciones del tóxico, mientras que las larvas de *C. nobilii* expuestas durante su desarrollo embrionario mostraron una disminución en su capacidad infectiva proporcionalmente al aumento de las concentraciones del insecticida. Sobre este hecho,

las poblaciones de los hospedadores definitivos de *C. nobilii*, podrían incrementarse en las áreas donde el Malatión es usado.

Relyea (2004) evaluó el efecto sobre el crecimiento y la supervivencia del Malatión y el Glifosato en 5 especies de anfibios, en etapa larval, *Rana pipiens*, *Hyla versicolor*, *Bufo americanus*, *R. clamitans* y *R. catesbeiana*, en dosis de 1 y 2 mg/L. Solo *H. versicolor* no se vio afectada en el crecimiento ni en la supervivencia por ninguno de los dos plaguicidas. Para el resto de las especies, el impacto de los pesticidas fue mucho más relevante en el crecimiento de los renacuajos que en su supervivencia. En *C. nobilli* el efecto tanto del Glifosato como del Malatión sobre supervivencia y desarrollo fue a concentraciones menores en un orden de magnitud a las ensayadas para larvas de anuros. La exposición a Malatión en embriones de *C. nobilii*, a diferencia del resultado alcanzado por Relyea en renacuajos, afectó la supervivencia, considerando que existió un aumento significativo de embriones no viables a la máxima concentración ensayada, 0.22 mg Mal/L, una concentración menor que la evaluada por este autor para el Malatión. Un estudio en mesocosmos de Relyea (2005) revela una disminución de la riqueza de especies del 30% con Malatión y un 22% con Glifosato tipo Roundup. La exposición a Malatión produjo la eliminación de cladóceros y también redujo la diversidad y biomasa de insectos predadores, tuvo efectos aparentemente positivos sobre varias especies de anfibios y no afectó a los caracoles presentes en el mesocosmos. El Glifosato no afecto al zooplancton, ni a los insectos predadores ni a los caracoles, sin embargo, eliminó completamente a dos de las especies de anfibios y redujo sensiblemente la abundancia de una tercera especie. A partir de los resultados de Relyea (2005) se podría prever que el Glifosato ejercería mayor efecto sobre especies de anfibios que sobre invertebrados, en tanto que el Malatión tendría el efecto inverso. En esta Tesis se determinó que el efecto del Malatión fue mayor que el de Glifosato en *C. nobilii*, un invertebrado, a concentraciones menores que las evaluadas por Relyea.

En el análisis de la sensibilidad de *C. nobilii* a los plaguicidas también debe considerarse la concentración que puede tener un cuerpo de agua dulce para los tres pesticidas evaluados (Tabla 3.2.7, página 84).

En el caso del Glifosato, para aplicaciones directas de formulado en el agua a una concentración de 4.2 kg e.a./ha, y asumiendo un 50% de cobertura foliar, la concentración máxima en el agua se encuentra entre 0.3 y 4.5 mg/L para cuerpos de agua con una profundidad entre 2 y 0.15 m, respectivamente (Giesy y col., 2000). La mayoría de los

arroyos de la región Pampeana muestran tales características, y por tanto es posible que se encuentren tales valores de concentración en sus aguas. Si consideramos lo expuesto por Peterson y col. (1994), y por Perkins y col. (2000), se pueden encontrar concentraciones con un valor de 2.88 mg Gli i.a./L en ambientes de agua dulce poco profundos. Y si se asume una aplicación terrestre única de 4.2 kg Roundup/ha, el programa GENEEC estima un pico de concentración en la superficie acuática que se encuentra entre 0.024 a 0.09 mg Roundup/L, resultando en una predicción de una concentración de exposición máxima de 0.13 mg Gli e.a/L para cuerpos de agua estáticos que reciben aportes de campos cercanos por escorrentía (Giesy y col., 2000). Estos valores son mayores en un orden de magnitud a las que generan efecto sobre *C. nobilii*.

Para el Carbendazim, internacionalmente se puede considerar también el reporte realizado por Dang y Smit (2008), en el que se dan los valores de las máximas concentraciones permitibles (MPCeco, water, Maximum Permissible Concentration), aceptables (MACeco, water, Maximum Acceptable Concentration), y de la concentración de riesgo (SRCeco, water Serious Risk Concentration). Los valores citados fueron de 0.006 mgCar/L para MPCeco y para MACeco, y de 0.05 mg Car/L para SRCeco, los mismos son iguales o mayores que los que pueden afectar a los estadios preparasitarios de *C. nobilii*, encontrándose en el mismo orden de magnitud.

Para Malatión, las dosis de aplicación indicadas para la agricultura se encuentran entre 0.196 y 7 kg Mal i.a./ha, y la concentración ambiental estimada en agua se encuentre posiblemente entre 0.291 y 0.00294 mg Mal/L (USEPA, 2006). Por consiguiente, los embriones y las larvas de *C. nobilii* serían afectados por concentraciones que pueden encontrarse en el ambiente.

En resumen, en esta Tesis se determinó que el Glifosato, el Carbendazim y el Malatión afectaron la supervivencia larval y el desarrollo embrionario, a valores que se encuentran por debajo del nivel guía para protección de la biota acuática en Argentina para Glifosato, pero que son superiores o se encuentran en el mismo orden para el Malatión y el Carbendazim respectivamente (Tabla 3.2.7, página 84) (http://www.obraspublicas.gov.ar/hidricos/documentos/calidad/ 2003).

Tabla 3.2.7. Tiempo de vida medio (TD_{50}), Concentración Inhibitoria media (CI_{50}) más baja calculada para los plaguicidas en los bioensayos de embriones y larvas, nivel guía para la protección de la vida acuática en Argentina (NGPVA) y concentración esperable en el ambiente (CAE), para los tres plaguicidas evaluados en esta Tesis (Battaglin y col., 2005, para Glifosato; Cuppen y col. 2000; Daam y col., 2009, para Carbendazim; y USEPA, 2006, para Malatión).

Parámetros	***Glifosato***	***Carbendazim***	***Malatión***
TD_{50}	7 - 14 días	15 - 175 días	4-12 días
CI_{50} mg/L	0.045	0.00741	0.036
NGPVA mg/L	< 0.24	0.001	< 0.0001 mg/L
CAE mg/L	0.024 -4.5	0.006 - 0.042	0.291 - 0.00294

A partir de los resultados obtenidos y de las comparaciones realizadas con otros organismos dulceacuícolas, se puede postular que *C. nobilii* es una especie sensible a los tres plaguicidas evaluados. Los resultados obtenidos sugieren que bajo condiciones como las descriptas anteriormente, las concentraciones ambientales de Glifosato, Carbendazim y Malatión pueden ser un riesgo potencial de toxicidad para *C. nobilii*.

CAPÍTULO III
EFECTO DEL AGUA DEL RÍO SAUCE GRANDE SOBRE LA TOXICIDAD DE LOS PLAGUICIDAS EN *Chordodes nobilii*

INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores se ha demostrado que, bajo condiciones de laboratorio, en medio artificial (agua reconstituida EPA), los estadios preparasitarios de *C. nobilii* son sensibles a los tres plaguicidas ensayados: Glifosato, Carbendazim y Malatión.

Una crítica importante a los ensayos de laboratorio es la dualidad que representa mantener condiciones de ensayo estables a fin de facilitar la repetitividad de resultados, pero que dificultan la extrapolación al medio natural. Una fuente de variación importante en el medio es la composición de las aguas naturales, que normalmente por diferentes reacciones químicas disminuyen el efecto de los tóxicos vertidos en ellas.

En consideración de este punto en particular cabe preguntarse si la sensibilidad demostrada por la especie de ensayo disminuye en agua de su ambiente, planteándose la siguiente hipótesis *"bajo condiciones experimentales semejantes el plaguicida en medio natural mostrará un efecto menor sobre los estadios preparasitarios de Chordodes nobilii que en agua reconstituida"*.

El **objetivo** para este capítulo es determinar si el medio de ensayo ejerce efecto en la toxicidad de los plaguicidas sobre los estadios preparasitarios de *C. nobilii*, bajo condiciones estandarizadas de laboratorio.

Para responder a esta pregunta se expuso a los estadios preparasitarios a las mismas concentraciones nominales y condiciones experimentales indicadas previamente para los tres plaguicidas pero utilizando como medio de ensayo muestras de agua del río Sauce Grande. En la Tabla 3.3.1 (página 86) se indican los valores analíticos de las concentraciones ensayadas en cada caso.

Tabla 3.3.1. Concentraciones (valores analíticos) comparables para los tres plaguicidas en los distintos bioensayos de embriones (E.) y larvas (L), en los cuales se utilizó como medio de ensayo agua reconstituida (EPA) o agua del río Sauce Grande (SG).

Plaguicida	***Bioensayo***	***Concentraciones (mg/L)***					
Glifosato	**E-EPA**	0.07	0.37	0.74	1.48	2.96	5.93
	L-EPA	0.07	0.37	0.74	1.48	2.96	5.93
	E-SG	0,07	0,33	0,67	1,34	2,67	5,34
	L-SG	0,08	0,39	0,78	1,56	3,12	6,24
Carbendazim	**E-EPA**	0.01	0.02	0.04	0.09	0.18	0.36
	L-EPA	0.01	0.02	0.04	0.08	0.15	0.30
	E-SG	0.01	0.02	0.04	0.09	0.18	0.36
	L-SG	0.01	0.02	0.04	0.08	0.15	0.30
Malatión	**E-EPA**	0.036	0.055	0.073	0.11	0.22	---
	L-EPA	0.04	0.05	0.07	0.11	0.22	---
	E-SG	0.04	0.05	0.07	0.11	0.22	---
	L-SG	0.08	0.12	0.16	0.23	0.47	---

El medio de ensayo utilizado fue agua del río Sauce Grande (SG). Las muestras para cada ensayo fueron colectadas previamente, y mantenidas en cámaras refrigeradas durante no más de 7 días previos al inicio del mismo.

Si bien no formaba parte de los objetivos de esta tesis, se realizaron determinaciones de distintos parámetros físico químicos del agua del río Sauce Grande para contar con una noción básica del estado del medio que habita *Chordodes nobilii*.

En las tablas 3.3.2 a 3.3.4 se exponen los resultados de las mediciones de distintos parámetros fisicoquímicos. En la tabla 3.3.2 se muestran los valores de los parámetros medidos en campo; en la tabla 3.3.3 (página 87), los valores de los parámetros medidos en laboratorio; y en la tabla 3.3.4 (página 87), los parámetros medidos de los medios de dilución utilizados en los ensayos con plaguicidas.

Tabla 3.3.2. Parámetros físicos y químicos medidos en el río Sauce Grande durante las distintas campañas realizadas a la zona de muestreo. T (Temperatura), OD (oxígeno disuelto), TSD (total de sólidos disueltos), y C (conductividad).

T *(ºC)*	***OD*** *(mg/L)*	***TSD*** *(mg/L)*	***C*** *(µS)*	***pH***
19-26	6.4-15 ±1	111-284	166 - 412	7.73 – 8.74

Tabla 3.3.3 Parámetros físico-químicos medidos en laboratorio para muestras del río Sauce Grande. Se muestran los rangos de valores para cada parámetro. T (Temperatura), D (dureza), C (conductividad), NH_4 (amonio), PRS (fósforo reactivo soluble), OC (organoclorados) y OF (organofosforados) [1]

T *(ºC)*	***D*** *(mgCO_3Ca/L)*	***C*** *(µS)*	***pH***	***NH_4*** *(µg N-NH_4/L)*	***PRS*** *(mg P- PO_4^- /L)*	***OC*** *(µg/L)*	***OF*** *(µg/L)*
19	100.1 -30	95.1	7.73 -7.83	45 - 46	0.04 -0.03	< 0.03	< 0.02

[1]Plaguicidas OC y OF medidos en agua y sedimento α HCH, β HCH, γ HCH, aldrin, endrin, DDT, α clordano, γ clordano, α endosulfan, β endosulfan, heptacloro, heptacloro epoxido, hexacloro, benceno, lindano, mirex, metoxicloro, bromofos, clorfenvinfos, clorpirifos, coumafost, diazinon, etil bromofos, etion, fenitrotion, metil paratión, malatión, dieldrin

Tabla 3.3.4 Valores para pH, D (dureza) y C (conductividad) de los medios de ensayo utilizados durante la realización de esta Tesis.

Medio Ensayo	***pH***	***D (mgCO_3Ca/L)***	***C (µS)***
EPA	7.6–8.0	160–180	816-1180
SG	7.9-8.7	30-90	95.1-495

En una primera aproximación, se puede observar que los valores de OD, pH y TSD (Tabla 3.3.2, página 86), se encuentran dentro de los rangos esperados para este tipo de ambiente (Lopez Cazorla y col., 2003). Otro punto importante es que no se registró contaminación térmica, y los niveles para plaguicidas y metales pesados en aguas superficiales se encontraron por debajo de los niveles de detección (Tabla 3.3.3), al igual que en sedimento (valores no tabulados). El nivel de amonio se encuentra considerablemente por debajo del nivel guía para protección de la biota acuática ($\leq$ 0.05 – 0.47 mg/L) según la Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación (www.obraspublicas.gov.ar/hidricos/documentos/calidad/amoniaco.pdf). Finalmente, se debe destacar que la conductividad y la dureza (Tabla 3.3.3 y Tabla 3.3.4) mostraron poseer un rango amplio adjudicable a la variación de caudal debido a precipitaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para ninguno de los ensayos se registraron diferencias significativas entre los controles con agua EPA y aquellos con agua del medio (SG). Esto valida el uso del medio SG como control y por tanto se asume que los efectos observados en los tratamientos se deben a los plaguicidas y no al medio de dilución (Apéndice II, Tabla 25, página 139).

EMBRIONES

En agua del río Sauce Grande (SG) solamente el Carbendazim inhibió significativamente el desarrollo embrionario de *Chordodes noblii* a partir de 0.04 mg Car/L y completamente a partir de 0.08 mg Car/L (Figura 3.3.1; Apéndice II, Tablas 27 y 28, página 139 y 140). La CI_{50} para desarrollo embrionario obtenida para el Carbendazim en SG fue de 0.03 mg Car/L. Es importante notar que la inhibición del desarrollo se dio en un rango de incremento de concentración relativamente pequeño. El umbral de efecto podría establecerse de manera arbitraria en 0.02 mg Car/L. El Carbendazim también generó un efecto subletal, ya que las larvas que lograron eclosionar de los huevos expuestos mostraron una eficiencia significativamente menor que el control en la infección de su hospedador (Figura 3.3.3, página 90, Apéndice II, Tablas 32 y 33, página 141).

El Glifosato y el Malatión no inhibieron el desarrollo embrionario (Apéndice II, Tablas 26 y 29, páginas 140 y 141), pero las larvas que eclosionaron de los huevos expuestos mostraron una capacidad infectiva significativamente menor que sus controles respectivos, desde 0.67 mg Gli/L para el Glifosato y 0.05 mg Mal/L para el Malatión (Figura 3.3.2 y 3.3.4., página 89 y 90; Apéndice II, Tablas 30 y 31 para el Glifosato, página 140 y 141, y Tablas 34 y 35 para el Malatión, páginas 141 y 142).

El orden de toxicidad decreciente de los plaguicidas para los embriones fue Carbendazim > Malatión > Glifosato, encontrándose los valores de las CI_{50} para IIMA-E en 0.01, 0.03 y 0.57 mg/L respectivamente, siendo los embriones significativamente menos sensibles para el Glifosato (Tabla 3.3.5, página 90).

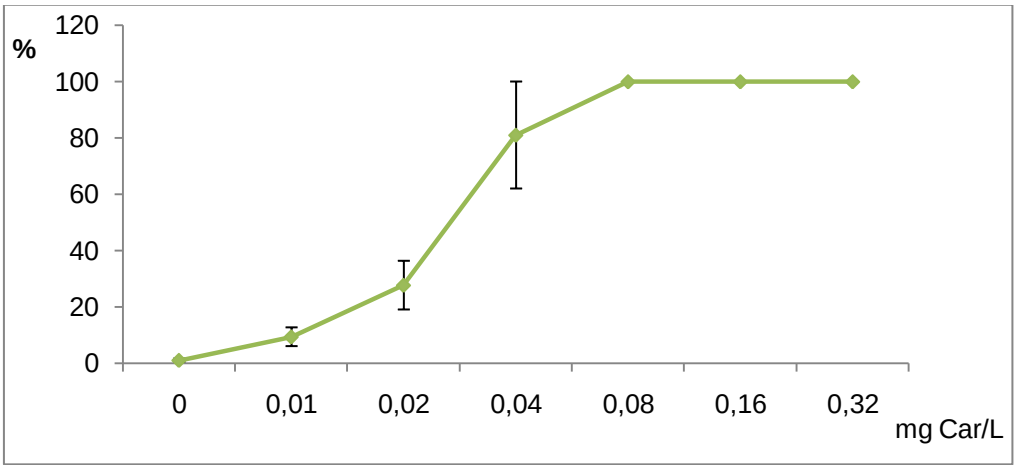

Figura 3.3.1. % de ENV (Embriones No Viables) obtenidos luego de exponer los huevos a Carbendazim utilizando como medio de dilución agua del río Sauce Grande.

LARVAS

La supervivencia larval se vio afectada significativamente desde la menor concentración ensayada en todos los casos (Figuras 3.3.2 - 3.3.4, páginas 89-90, Apéndice II, Tablas 36 a 41, páginas 176 -178). El orden de toxicidad decreciente para embriones se mantuvo en las larvas, siendo, Carbendazim > Malatión > Glifosato, con valores de CI_{50}-48h-IIMA-L de 0.03, 0.09 y 0.36 mg/L respectivamente (Tabla 3.3.5, página 90).

Con SG como medio de ensayo, tanto el Malatión como el Carbendazim ejercieron un efecto concentración dependiente sobre todas las variables analizadas (Apéndice II, Tabla 68, página 152), si bien para el Malatión el aumento de los ENV con el aumento de la concentración no fue significativo (Apéndice II, Tabla 29, página 140). En tanto que el Glifosato solamente demostró un efecto concentración dependiente sobre el IIMA-E y la supervivencia larval (Apéndice II, Tabla 68, página 152).

Observando las figuras 3.3.2 - 3.3.4 se puede predecir que, los embriones resultaron más sensibles que las larvas al Carbendazim y al Malatión, pero no al Glifosato. Al contrastar las CI_{50} obtenidas para IIMA-E e IIMA-L para cada plaguicida (Tabla 3.3.5, página 90), se confirma lo supuesto a partir de los gráficos.

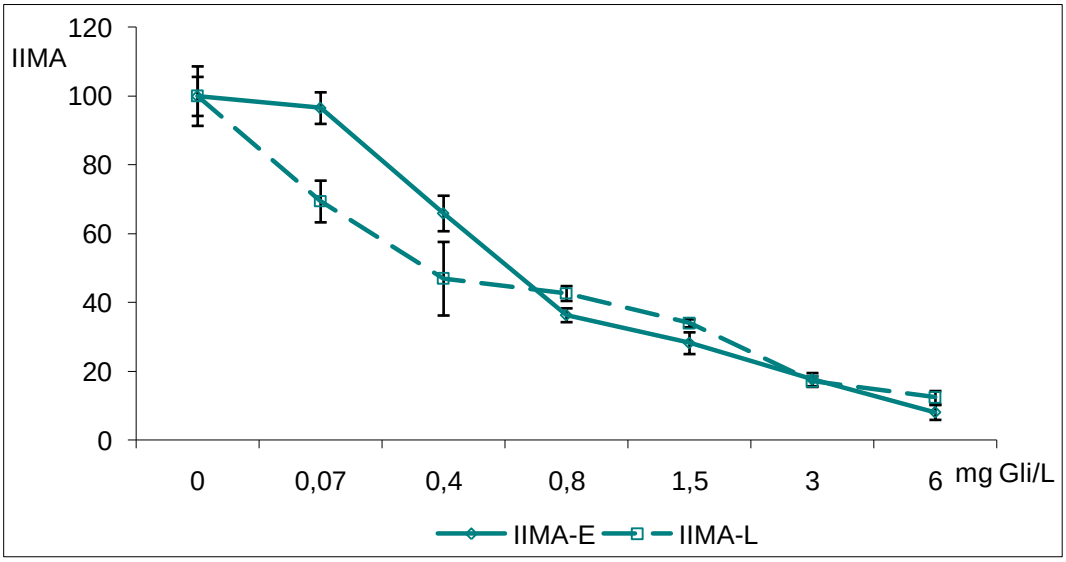

Figura 3.3.2. Efecto del Glifosato en los estadios preparasitarios embriones (E) y larvas (L) a través del IIMA obtenido en ambos ensayos, cuando el medio de ensayo es agua del río sauce Grande. Se grafica el Índice de Abundancia Media (IIMA) ± ES observados para el control y las concentraciones ensayadas. Valores expresados como media aritmética por tratamiento para IIMA como porcentaje referido al control.

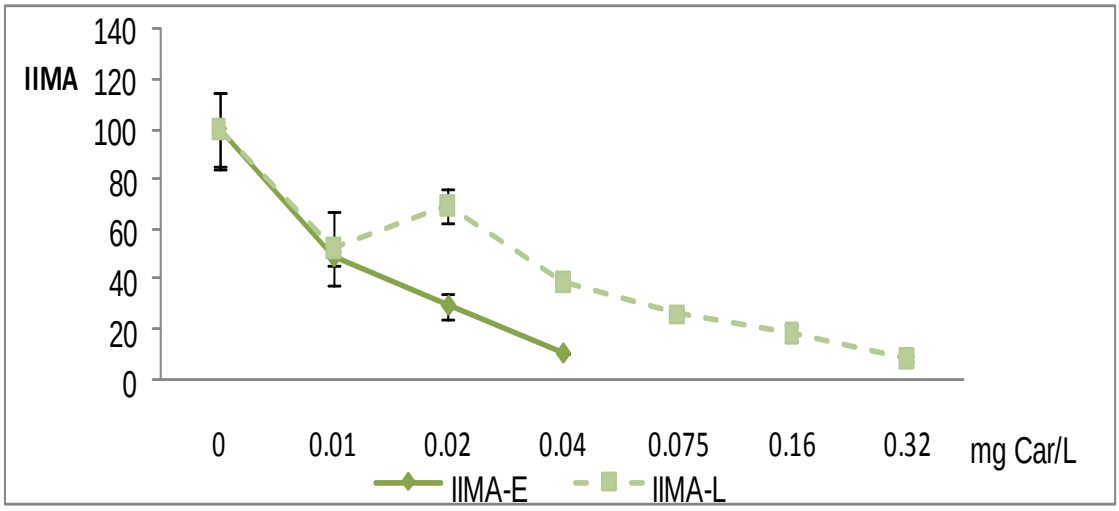

Figura 3.3.3. Efecto del Carbendazim en los estadios preparasitarios embriones (E) y larvas (L.) a través del IIMA obtenido en ambos ensayos, cuando el medio de ensayo es agua del río Sauce Grande. Se grafica el Índice de Abundancia Media (IIMA) ± ES observados para el control y las concentraciones ensayadas. Valores expresados como media aritmética por tratamiento para IIMA como porcentaje referido al control.

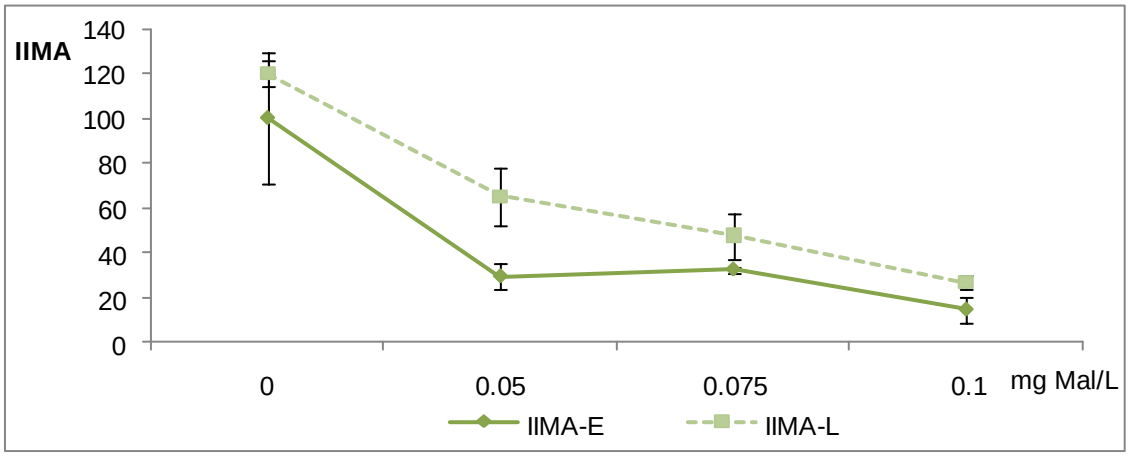

Figura 3.3.4. Efecto del Malatión en los estadios preparasitarios embriones (E) y larvas (L) a través del IIMA obtenido en ambos ensayos, cuando el medio de ensayo es agua del río sauce Grande. Se grafica el Índice de Abundancia Media (IIMA) ± ES observados para el control y las concentraciones ensayadas. Valores expresados como media aritmética por tratamiento para IIMA como porcentaje referido al control.

Tabla 3.3.5 CI_{50}: Concentración Inhibitoria media obtenida para los plaguicidas estudiados cuando el medio de dilución fue agua del río Sauce Grande (SG).

Tóxico	Punto Final	CI_{50} (mg/L)
Glifosato en SG	IIMA-E	0.570
	IIMA-L	0.357
Carbendazim en SG	ENV	0.032
	IIMA-E	0.011
	IIMA-L	0.028
Malation en SG	IIMA-E	0.031
	IIMA-L	0.089

Comparaciones de efecto del medio (SG vs EPA)

Para realizar las comparaciones entre medios de ensayo los tres puntos finales se relativizaron respecto de los controles respectivos de cada ensayo. En el caso de los ENV, las comparaciones se realizaron a través de la variable Índice ENVr, que se obtuvo al dividir los valores obtenidos para cada repetición por la media de ENV de su control. En tanto que para evaluar el IIMA-E y el IIMA-L, los valores se relativizaron como porcentajes, respecto a la media de su control, identificandose como IIMA-Er e IIMA-Lr, respectivamente.

El Glifosato tanto en medio SG como en medio EPA no produjo un aumento significativo de los ENV, por consiguiente no se realizaron comparaciones entre los tratamientos de ambos ensayos.

El Carbendazim generó inhibición del desarrollo embrionario solamente en medio SG (CI_{50} de 0.03 mg/L), en tanto que en medio EPA el efecto fue mucho más débil, ya que ni siquiera generó un aumento significativo de los ENV (Figura 3.3.5), pero al contrastar cada concentración evaluada en ambos medios solamente se hallaron diferencias significativas para las concentraciones en las que hubo inhibición total en medio SG (Apéndice II, Tabla 42, página 144).

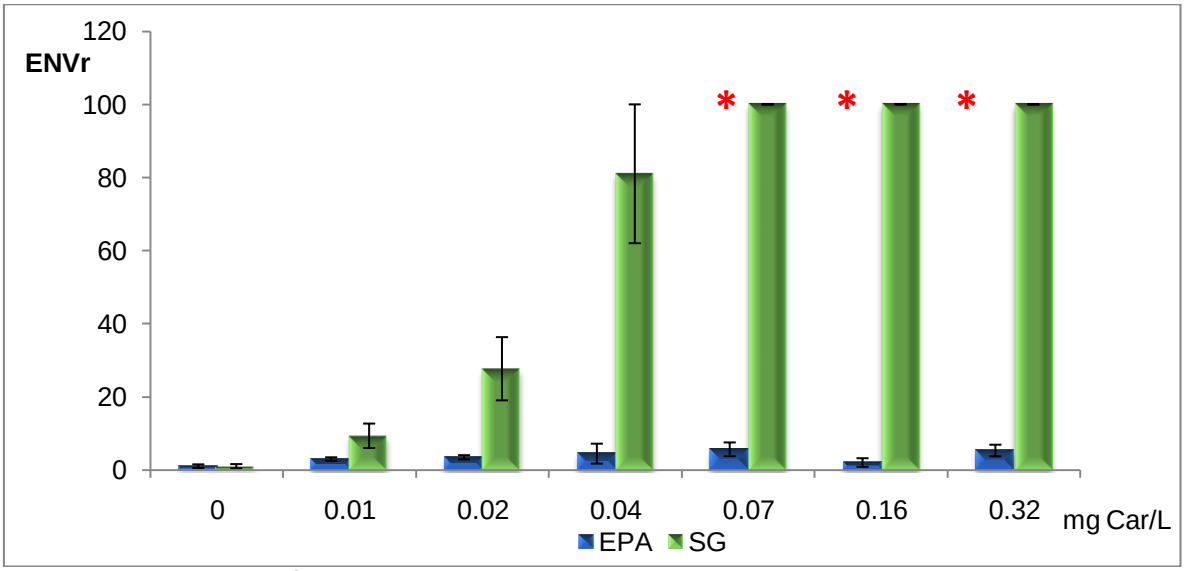

Figura 3.3.5. Comparación entre tratamientos de la variable ENVr para los bioensayos realizados con Carbendazim con agua del río Sauce Grande (SG) y agua reconstituida (EPA) como medio de dilución. En el eje x se muestran las concentraciones nominales. * expresan diferencia significativa entre concentraciones comparables.

Para Malatión (Figura 3.3.6), no existen diferencias significativas, según el medio de ensayo, para ninguna de las concentraciones comparables (Apéndice II, Tabla 43, página 144).

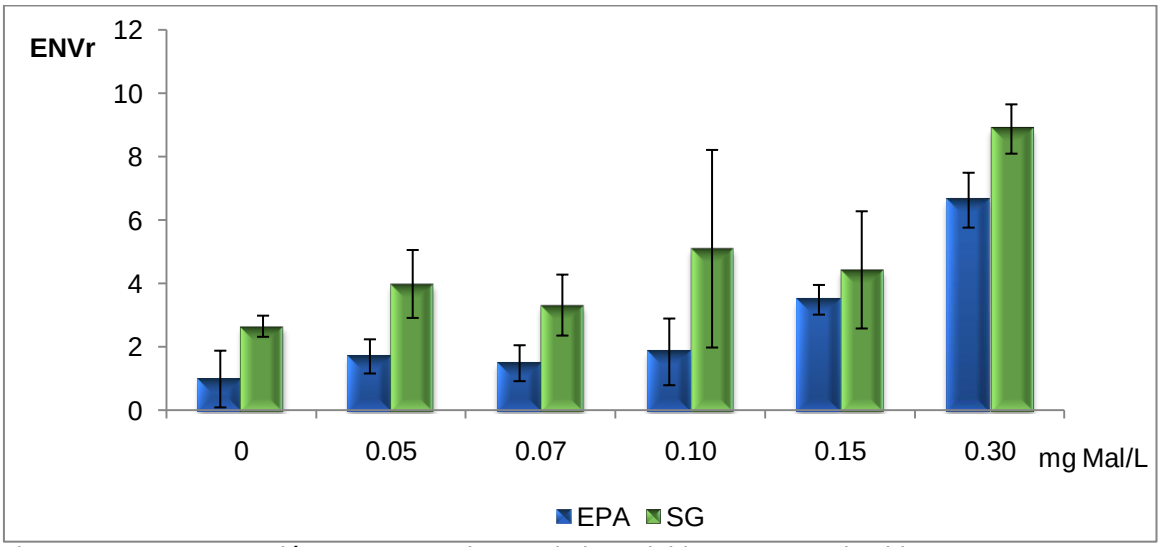

Figura 3.3.6. Comparación entre tratamientos de la variable ENVr para los bioensayos realizados con Malatión con agua del río Sauce Grande (SG) y agua reconstituida (EPA) como medio de dilución. En el eje x se muestran las concentraciones nominales.

Cuando se contrastan los resultados obtenidos para la variable IIMA-E entre concentraciones comparables de ambos medios, EPA y SG, se obtienen resultados diversos. En el caso del Glifosato (Figura 3.3.7) el IIMA-E mostró diferencias significativas solamente para 0.37 mg Gli/L en medio EPA y 0.33 mg Gli/L en medio SG (Apéndice II, Tabla 44, página 145).

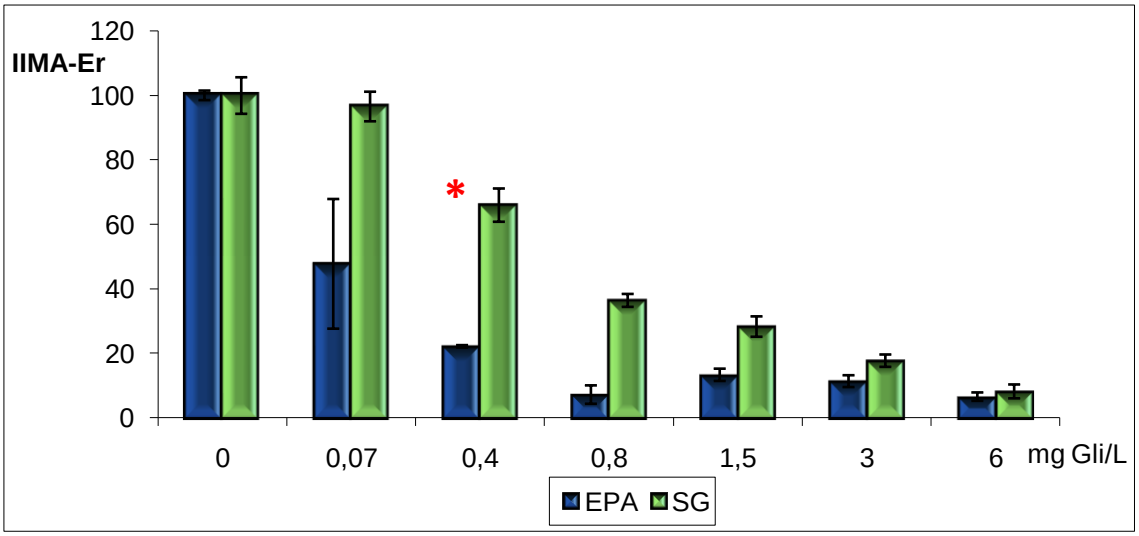

Figura 3.3.7. Comparación entre tratamientos para la variable IIMA-Er, (valor IIMA-E expresado como porcentaje relativo a su control), para los bioensayos realizados con Glifosato como formulado con agua del río Sauce Grande (SG) y agua reconstituida (EPA) como medio de dilución. * expresan diferencia significativa entre concentraciones comparables. En el eje x se muestran las concentraciones nominales.

Para Carbendazim (Figura 3.3.8), la menor concentración ensayada muestra diferencias significativas de efecto entre ambos medios (Apéndice II, Tabla 45, página 145). A 0.04 mg Car/L la capacidad infectiva es tan baja para SG como para EPA. Se debe tener en cuenta que a partir de 0.08 mg Car/L en medio natural (SG) las larvas no eclosionaron.

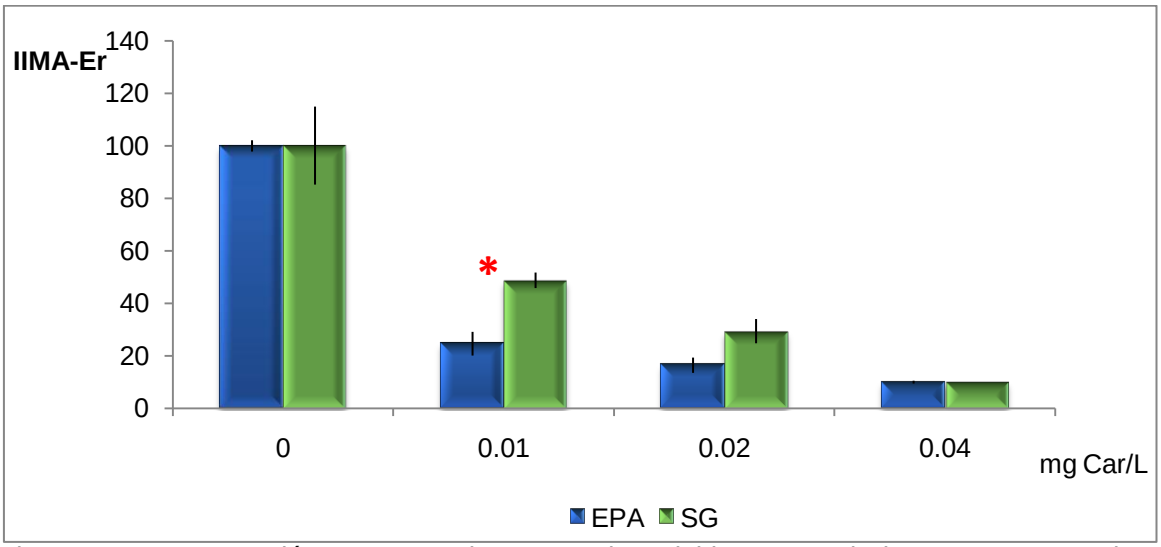

Figura 3.3.8. Comparación entre tratamientos para la variable IIMA-Er, (valor IIMA-E expresado como porcentaje relativo a su control), para los bioensayos realizados con Carbendazim con agua del río Sauce Grande (SG) y agua reconstituida (EPA) como medio de dilución.
* expresan diferencia significativa entre concentraciones comparables. En el eje x se muestran las concentraciones nominales.

Cuando se compara la capacidad infectiva de las larvas eclosionadas de huevos expuestos al Malatión en ambos medios (Figura 3.3.9, página 94), se puede concluir que si bien las diferencias estadísticamente significativas no se registran, para la totalidad de las concentraciones comparables (Apéndice II; Tabla 46, página 145), el agua del SG atenúa los efectos del Malatión.

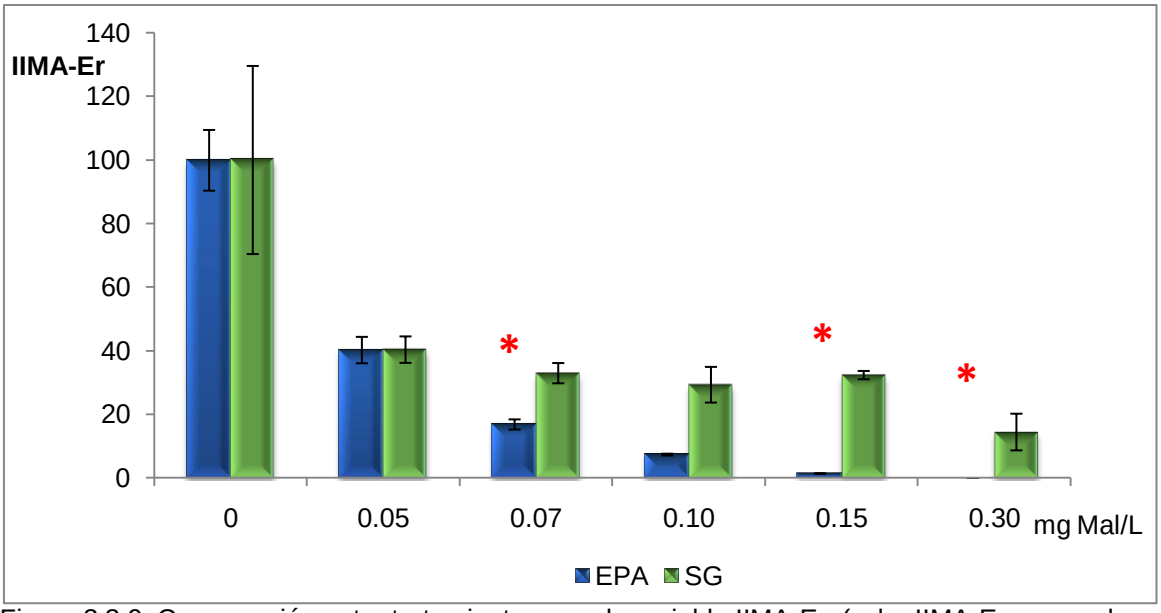

Figura 3.3.9. Comparación entre tratamientos para la variable IIMA-Er, (valor IIMA-E expresado como porcentaje relativo a su control), para los bioensayos realizados con Malation con agua del río Sauce Grande (SG) y agua reconstituida (EPA) como medio de dilución. * expresan diferencia significativa entre concentraciones comparables. En el eje x se muestran las concentraciones nominales.

Al comparar la supervivencia larval en ambos medios para Glifosato no se observa un efecto claro del medio (Figura 3.3.10). Las diferencias significativas entre tratamientos comparables no determinan una tendencia manifiesta (Apéndice II, Tabla 47, página 146).

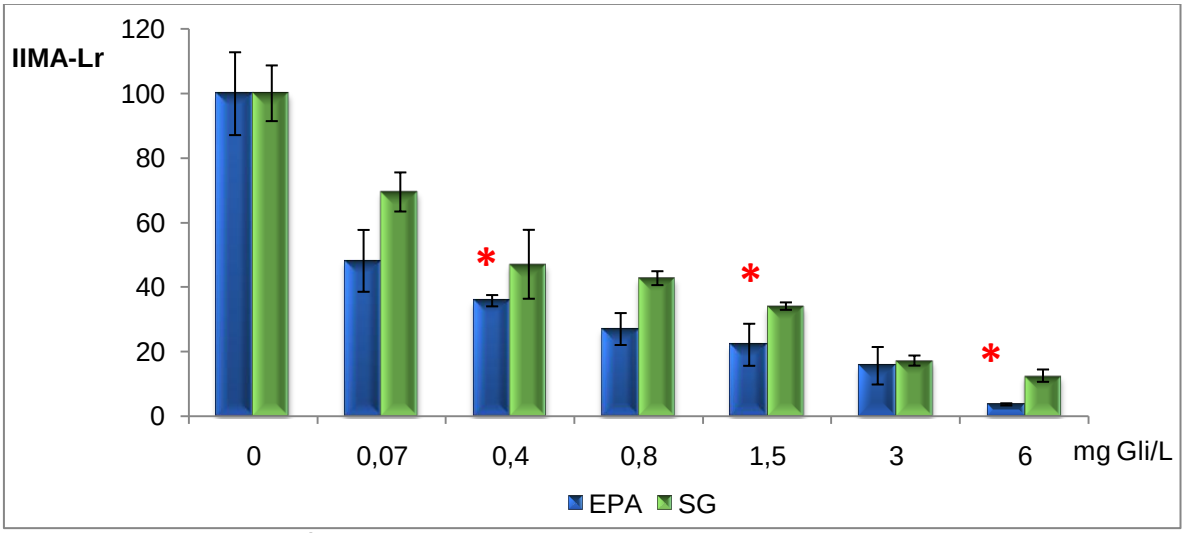

Figura 3.3.10. Comparación entre tratamientos para la variable IIMA-Lr, (IIMA-L expresada como porcentaje relativo a su control) para los bioensayos realizados con Glifosato como formulado con agua del río Sauce Grande (SG) y agua reconstituida (EPA) como medio de dilución. * expresan diferencia significativa entre concentraciones comparables. En el eje x se muestran las concentraciones nominales.

A diferencia del herbicida, las larvas expuestas tanto al Carbendazim (figura 3.3.11), como al Malatión (Figura 3.3.12), serían más sensibles al fungicida y al insecticida en agua reconstituida (Tabla 48 y 49, página 147)

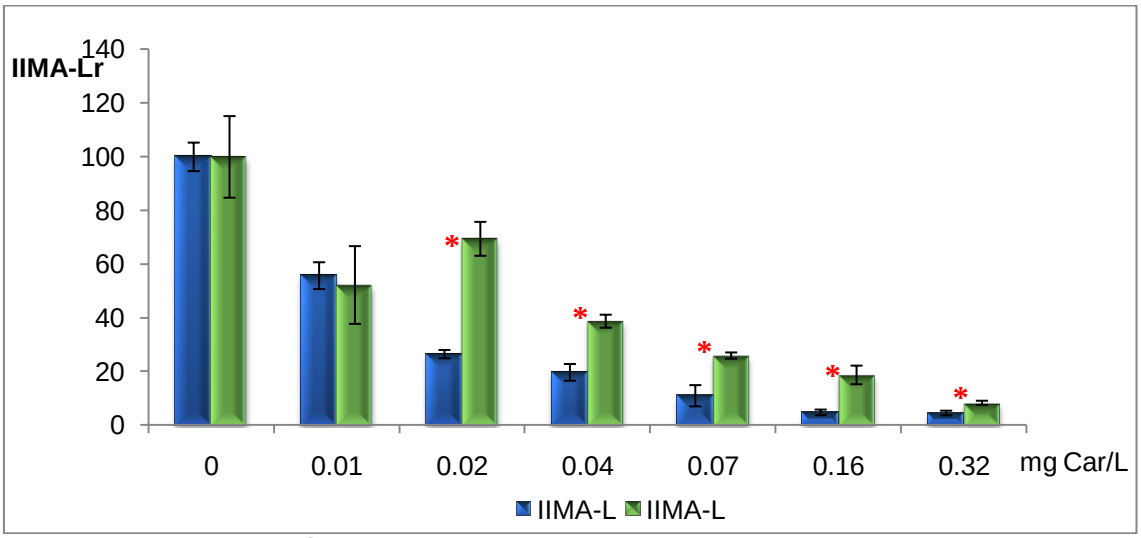

Figura 3.3.11. Comparación entre tratamientos para la variable IIMA-Lr, (IIMA-L expresada como porcentaje relativo a su control) para los bioensayos realizados con Carbendazim con agua del río Sauce Grande (SG) y agua reconstituida (EPA) como medio de dilución. * expresan diferencia significativa entre concentraciones comparables. En el eje x se muestran las concentraciones nominales.

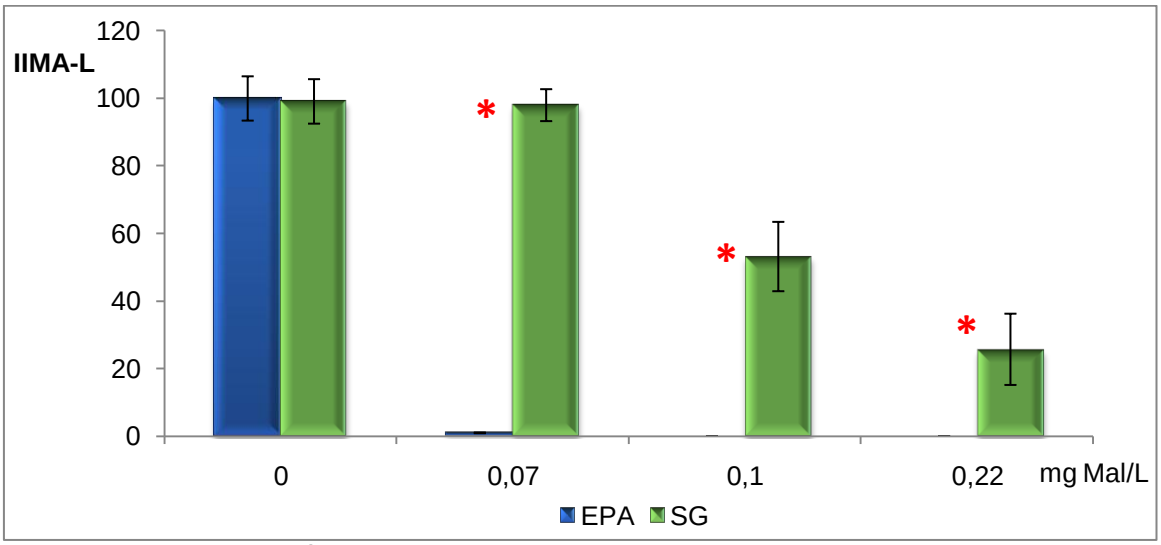

Figura 3.3.12. Comparación entre tratamientos para la variable IIMA-Lr, (IIMA-L expresada como porcentaje relativo a su control) para los bioensayos realizados con Carbendazim con agua del río Sauce Grande (SG) y agua reconstituida (EPA) como medio de dilución. * expresan diferencia significativa entre concentraciones comparables. En el eje x se muestran las concentraciones nominales.

En resumen, cuando se consideran los efectos de los plaguicidas en medio natural respecto del medio artificial, se observa que:

El Glifosato determina un efecto subletal (IIMA-E) en ambos medios, y no se puede determinar que el medio SG disminuya el efecto de este herbicida sobre el desarrollo embrionario. Lo mismo ocurre en su efecto sobre la supervivencia larval (IIMA-L).

Para Carbendazim el efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario se da cuando el medio de ensayo es agua del río Sauce Grande. El efecto subletal del Carbendazim (IIMA-E) no muestra una tendencia clara a diferenciarse según el medio de ensayo. Para la supervivencia larval (IIMA-L), por el contrario, el Carbendazim resultó menos tóxico en medio natural.

El Malatión en medio SG solamente mostró efecto significativo sobre el desarrollo embrionario si se considera a la variable IIMA-E, y es similar al generado en medio EPA. En tanto que para la supervivencia larval (IIMA-L) el medio SG determinaría una disminución del efecto del insecticida.

Más allá de que en ambos medios los plaguicidas demuestran tener un efecto muy importante sobre el desarrollo embrionario y la supervivencia larval para *C. nobilii*, la suposición inicial era que el medio natural, debido a su composición, disminuiría el efecto de los tóxicos sobre *C. nobilii*, pero los resultados obtenidos demuestran que no existe tal patrón, por consiguiente, según el plaguicida el medio puede disminuir el efecto, no tener efecto alguno e incluso aumentar el efecto del plaguicida sobre los estadios preparasitarios de la especie de ensayo. Debe destacarse que a pesar de que no se pudo distinguir un patrón claro de efecto del medio natural sobre los plaguicidas en general, cuando existen diferencias entre ambos medios de ensayo, este efecto sería menor en medio SG, con la única excepción del efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario para Carbendazim.

CAPÍTULO IV
VALIDACIÓN DE LOS PROTOCOLOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS CON LOS ESTADIOS PREPARASITARIOS DE *Chordodes nobilii*: SENSIBILIDAD A TRES TÓXICOS REFERENTES

INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores se confirmó que los primeros estadios de vida de *Chordodes nobilii* son sensibles al Glifosato, al Carbendazim y al Malatión, a concentraciones que pueden encontrarse en el ambiente. Estos resultados demuestran la importancia de caracterizar la respuesta de esta especie para investigar su potencial como un organismo de prueba para evaluaciones ecotoxicológicas.

El desarrollo de protocolos experimentales consistentes para evaluar la sensibilidad de los organismos a diferentes tóxicos es un proceso exhaustivo y complejo. Este no solo requiere la determinación de la sensibilidad del grupo evaluado, sino también determinar si las técnicas usadas son apropiadas y reproducibles para evaluar diferentes tóxicos. El mismo se vuelve más complejo cuando el objetivo es evaluar la sensibilidad de organismos no estandarizados que no se encuentran entre los grupos ecológicos más utilizados (consumidores, depredadores) en la evaluación ecotoxicológica, tales como los parásitos con ciclos de vida complejos.

La valoración objetiva de la idoneidad de los organismos candidatos para la evaluación ecotoxicológica requiere la comparación de respuestas biológicamente medibles (puntos finales) con un rango de concentraciones de un tóxico referente. De esta manera, la sensibilidad de los organismos puede ser clasificada, identificándose así la especie más apropiada (Gopalakrishnan y col., 2008).

Los tóxicos referentes son compuestos orgánicos e inorgánicos usados en procedimientos estándar, que generan información para la interpretación de los resultados de los ensayos toxicológicos; también son usados para realizar calibraciones intra-interlaboratorio (McNulty y col., 1999, Jorge y Moreira, 2005).

En esta tesis se seleccionaron tres tóxicos referentes reconocidos. El detergente Dodecil Sulfato de Sodio (DSS), y los metales Cadmio (como cloruro de cadmio) y Cromo (como dicromato de potasio) (Dorn y col. 1987; Días-Báez y col., 2004; Ong y Din, 2001), recomendados por US EPA (1993).

Todos los detergentes tienen como característica común la capacidad de disminuir la tensión superficial de los líquidos en que se disuelven. Según su disociación electrolítica se pueden clasificar en, Aniónicos (derivados del petróleo); Catiónicos (industria textil); No iónicos (muy utilizados en las industrias textil, metalúrgica, y farmacéutica); Anfolíticos (se ionizan y tiene propiedades como las de los dos primeros grupos). La acción nociva de los detergentes sobre las aguas es diversa; pueden actuar inhibiendo las oxidaciones biológicas y químicas y produciendo por tanto, en aguas muy contaminadas, una baja DBO. Al variar la tensión superficial del líquido en que se disuelven, dificultan la sedimentación primaria; en los lechos bacterianos y en los lodos activados de las estaciones depuradoras ejercen su acción inhibidora, perturbando por tanto el objetivo de depuración propuesto. Al utilizarse grandes cantidades de perborato sódico en su fabricación, producen un aumento progresivo del contenido en boro de las aguas superficiales; forman espumas que dificultan y paralizan los procesos de depuración artificial o natural. Por otra parte, la absorción de oxígeno del curso de agua a partir de la atmósfera se ve afectada al aparecer una película aislante; producen sabor desagradable y aumento del contenido de fosfatos en las aguas continentales, favoreciendo la proliferación de algas y los procesos de eutrofización (Seoánez Calvo, 1996).

El origen de los detergentes en los cursos de agua se debe al aporte de las industrias (textiles, tintorerías, etc.), aglomeraciones urbanas, agricultura (ya que son usados como componente de plaguicidas), entre otras causas. Después de haber sido utilizados pueden discurrir hasta los cursos de agua, presentando diferencias de concentración según las horas y el día de la semana, apareciendo por tanto variaciones a lo largo de todo el curso de agua. Las explotaciones ganaderas también utilizan cantidades notables de detergentes, sobre todo en los patios de lavado, paseo y corredores, generalmente estos residuos se unen a los purines y aguas de lluvia y son agregados al suelo por riego, o a los cursos de agua por vertido (Seoánez Calvo, 1996).

El DSS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) es uno de los surfactantes aniónicos sintéticos más frecuentemente utilizado en el mundo, con aplicaciones en productos del hogar, mezclas industriales, productos de limpieza, cosméticos, jabones líquidos, shampoos, productos para baños de burbuja y pasta de dientes. También ha sido usado como un emulsionante, agente humectante y adyuvante en insecticidas, como emulsionante y penetrante en barnices y removedores de pintura. Además, se ha usado como una herramienta en la investigación biológica. Esto ha sido posible por su capacidad para reducir la tensión superficial de las soluciones acuosas, para formar microemulsiones, y para solubilizar grasas y aceites, lo que conduce a la solubilización de la membrana

lipídica. Debido a la gran cantidad de aplicaciones en actividades antrópicas urbanas, el DSS es encontrado comúnmente en las aguas domésticas residuales. Dado que las principales rutas de exposición ambiental de los animales al DSS son las aguas, suelos y sedimentos contaminados, el DSS es usado como un tóxico de referencia en la evaluación toxicológica (Singer y Tjeerdema, 1993; Cserháti y col., 2002; Jorge y Moreira, 2005).

Entre los contaminante más dañinos para la biota acuática, se encuentran los metales pesados. Aunque algunos son esenciales para los organismos, como el cromo, cobre, hierro, molibdeno, selenio y zinc, pueden ser tóxicos si las concentraciones en el medio son elevadas. El plomo, el cadmio y el mercurio son altamente tóxicos (Espina y Vanegas, 2005).

En general los metales se caracterizan por su gran afinidad con el azufre, por esta razón inactivan las enzimas ya que se unen a los grupos sulfidrilos (-SH), también se enlazan a los grupos carboxilos (-COOH) y aminos (-NH2) de las proteínas. Por ejemplo, el Cd, Cu, Hg, Ag, Pb y Zn inhiben la acción de varias enzimas al formar enlaces covalentes con los radicales libres del sitio activo. Entre las enzimas cuya actividad es alterada por la exposición a los metales pesados, se destaca la Na-K-ATPasa branquial así como la lactato deshidrogenasa, las lipasas, amilasas y proteasas del hepatopáncreas de los crustáceos, de la glándula digestiva de los moluscos y el hígado de los peces. Algunos metales inhiben los procesos de transporte a través de las membranas celulares al unirse a estas, como el Cd, Cu, Pb y Hg (Moriarty, 1988, Espina y Vanegas, 2005).

En relación a los metales seleccionados como tóxicos referentes para esta Tesis se debe mencionar que las concentraciones de Cadmio y Cromo en ambientes dulceacuícolas se ha incrementado substancialmente como consecuencia de las actividades antrópicas. Dentro de los metales el Cadmio es más móvil que otros y es registrado como uno de los elementos más tóxicos para los organismos acuáticos. Tiene un tiempo de residencia en sistemas acuáticos relativamente alto (US EPA, 2007, Bouche, y col., 2000; Lienesch, y col., 2000). El Cromo se encuentra naturalmente en rocas, animales, plantas, suelo, cenizas volcánicas y gases. En el ambiente es encontrado a menudo como Cr trivalente (III), un oligoelemento naturalmente producido, esencial para la vida, y como Cr hexavalente (VI), que resulta de la actividad industrial, y es el segundo estado más estable. La solubilidad de los compuestos de cromo en agua varia dependiendo de los estados de oxidación, siendo Cr^{+6} la forma más soluble (Segura-Muñoz, y col., 2003; Téllez y col., 2004).

Debido a que es importante caracterizar la respuesta de *Chordodes nobilii* para investigar su potencial como un organismo de prueba para evaluaciones ecotoxicológicas, la exposición de los estadios preparasitarios de esta especie a los tres tóxicos referentes (DSS, Cd^{+2}, Cr^{+6}) demostrará la sensibilidad a los mismos, y permitirá validar el protocolo diseñado para los ensayos ecotoxicológicos.

El **objetivo** de este capítulo, en base a lo planteado anteriormente, es caracterizar la respuesta toxicológica de embriones y larvas de *C. nobilii* a Dodecil Sulfato de Sodio, Cadmio y Cromo.

En la Sección II, capítulo II (página 49 y 54) se detalló el protocolo seguido para evaluar toxicidad en los estadios preparasitarios de la especie de estudio.

En la tabla 3.4.1 se muestran las concentraciones nominales y analíticas ensayadas para los tres tóxicos referentes utilizados.

Tabla 3.4.1. Concentraciones nominales y analíticas para Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Dodecil Sulfato de Sodio (DSS) expresadas en mg/L

Toxico	**Bioensayo**	**Valores**	**Concentraciones (mg/L)**						
Cd	Embriones	*Nominal*	0	0.5	1	2	4	8	
		Analítico	ND	0.4	0.92	1.9	3.6	7.1	
	Larval	*Nominal*	0	0.5	1	2	4	8	--
		Analítico	ND	0.4	0.9	1.9	2.2	7.8	--
Cr	Embriones	*Nominal*	0	0.5	1	2	4	8	--
		Analítico	ND	0.4	0.9	1.8	3.8	7.8	--
	Larval	*Nominal*	0	0.5	1	2	4	8	--
		Analítico	ND	0.16	0.33	0.5	3.2	6.7	--
DSS	Embriones	*Nominal*	0	0.1	0.5	1	2	4	8
		Analítico	0	0.12	0.46	1.01	1.88	3.94	8.55
	Larval	*Nominal*	0	0.1	0.5	1	2	4	8
		Analítico	0	0.12	0.46	1.01	1.88	3.94	8.55

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EMBRIONES

Bajo las condiciones experimentales planteadas en los ensayos, la inhibición completa del desarrollo embrionario de *Chordodes nobilii* ocurrió solamente para el Cr^{+6} (Figura 3.4.1), a partir de 0.9 mg Cr^{+6}/L se registró aumento significativo de los ENV (Apéndice II, Tablas 52 y 53, páginas 147 y 148), y la presencia de malformaciones en las larvas eclosionadas de huevos expuestos (Figura 3.4.2, página 102). Estas larvas presentan características anatómicas semejantes a aquellas observadas en el caso del Malatión (Figura 3.2.5., página 81). Se obtuvo una CI_{50}-ENV de 1.8 mg Cr^{+6}/L, y las larvas que lograron eclosionar en las concentraciones más bajas ensayadas (0.4 y 0.9 mg Cr^{+6}/L) mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto de su control (Figura 3.4.5, página 104; Apéndice II, Tabla 59, página 149).

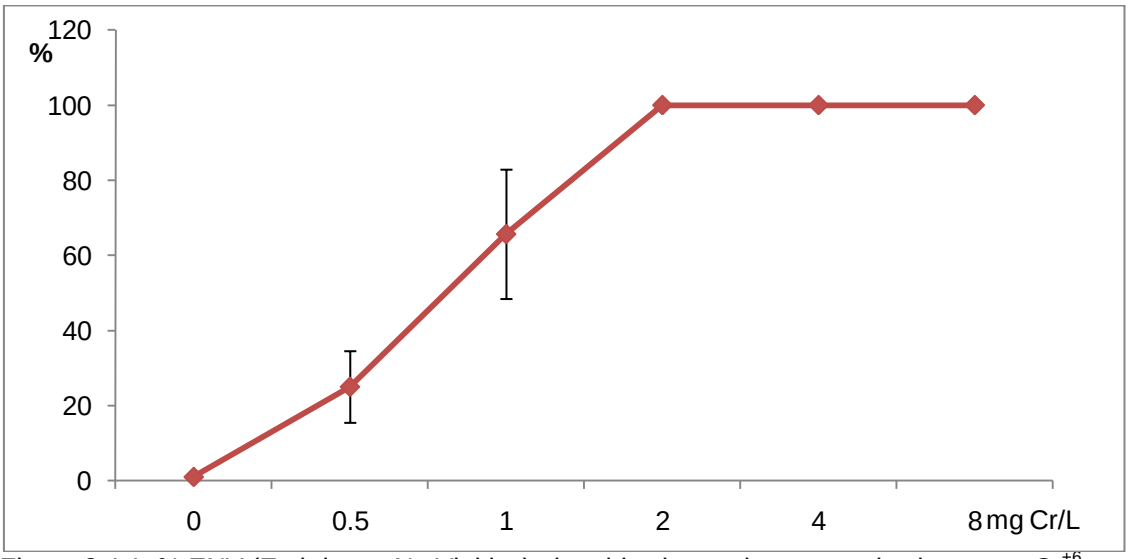

Figura 3.4.1. % ENV (Embriones No Viables) obtenidos luego de exponer los huevos a Cr^{+6}. Se grafica la media de los Embriones No Viables (ENV) ± ES, en el eje x se muestran las concentraciones nominales.

Tanto el Cd como el DSS a pesar de que no generaron un aumento significativo de los ENV, determinaron una disminución significativa de la capacidad infectiva de las larvas que lograron eclosionar de los huevos expuestos a estos tóxicos desde a la menor concentración ensayada, 0.1 mg DSS/L y 0.4 mg Cd^{+2}/L (Figura 3.4.3 y 3.4.4 respectivamente, página 103; Apéndice II, Tablas 54 y 55 para el DSS, página 148, y Tablas 56 y 57 para el Cd^{+2}, páginas 148 y 149).

Los tres tóxicos tuvieron un importante efecto concentración dependiente sobre la variable IIMA-E (Apéndice II, Tabla 68, página 152).

Los resultados expuestos anteriormente indicarían que el estadio embrionario de *C. nobilii* es más sensible al Cr^{+6} que a los otros dos tóxicos evaluados, ya que para concentraciones que se encuentran en el mismo orden de magnitud, el Cr^{+6} fue el único de los tres que logró inhibir el desarrollo embrionario, además de generar malformaciones en larvas eclosionadas de los huevos expuestos. Sin embargo, se debe considerar el hecho que el DSS generó un efecto subletal mayor (IIMA-E) que los otros dos tóxicos evaluados, con una CI_{50}-IIMA-E mucho más baja para el detergente. De acuerdo a los valores obtenidos para la CI_{50}-96h de IIMA-E, los embriones resultaron más sensibles al DSS que al Cd en un orden de magnitud (Tabla 3.4.2).

Tabla 3.4.2 CI_{50}: Concentración Inhibitoria media obtenida para los distintos tóxicos referentes.

Tóxico	Punto Final	CI_{50} mg/L
DSS	IIMA-E	0.064
	IIMA-L	0.061
Cd	IIMA-E	0.63
	IIMA-L	0.36
	ENV	0.71
Cr	IIMA-E	0.29
	IIMA-L	0.12

En consecuencia el orden decreciente de toxicidad para los embriones es el siguiente, DSS > Cr > Cd, y por consiguiente, el detergente es más tóxico que los metales, en este estadio.

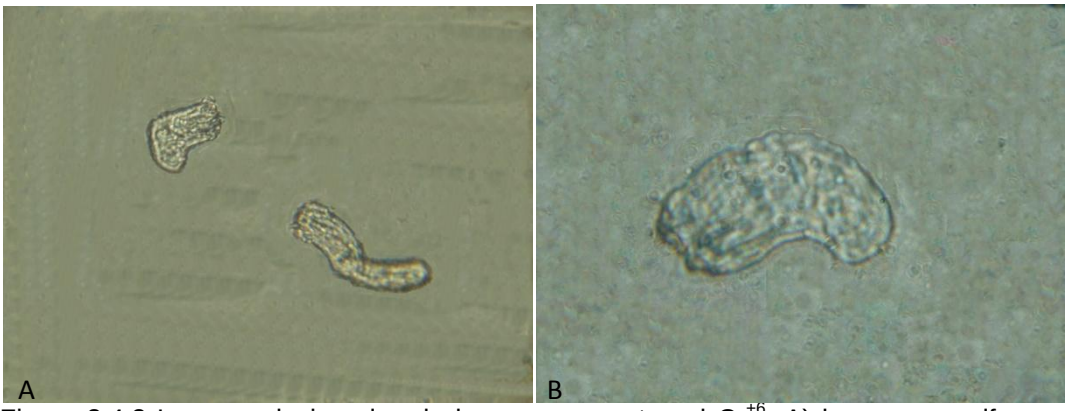

Figura 3.4.2 Larvas eclosionadas de huevos expuestos al Cr^{+6}, A) larva con malformaciones (LM) y larva normal (LN), aumento 10X40; B) larva con malformaciones, aumento 10X100.

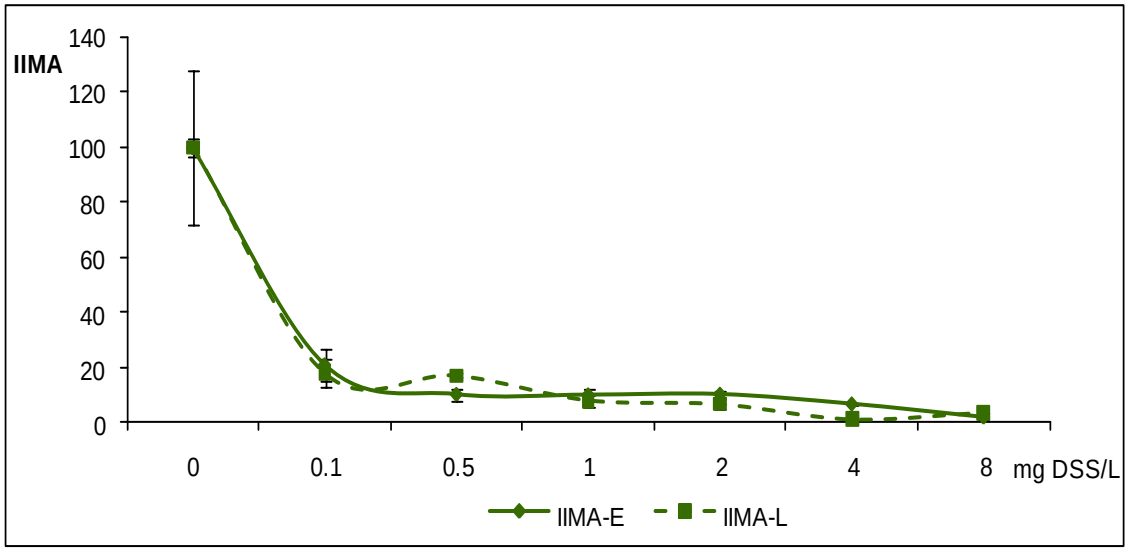

Figura 3.4.3 Efecto del DSS en los estadios preparasitarios embriones (E.) y larvas (L.) a través del IIMA. Se grafica el Índice de Abundancia Media (IIMA) ± ES observados para el control y las concentraciones ensayadas. Valores expresados como media aritmética por tratamiento para IIMA como porcentaje referido al control. En el eje x se expresan las concentraciones de ensayo como valores nominales.

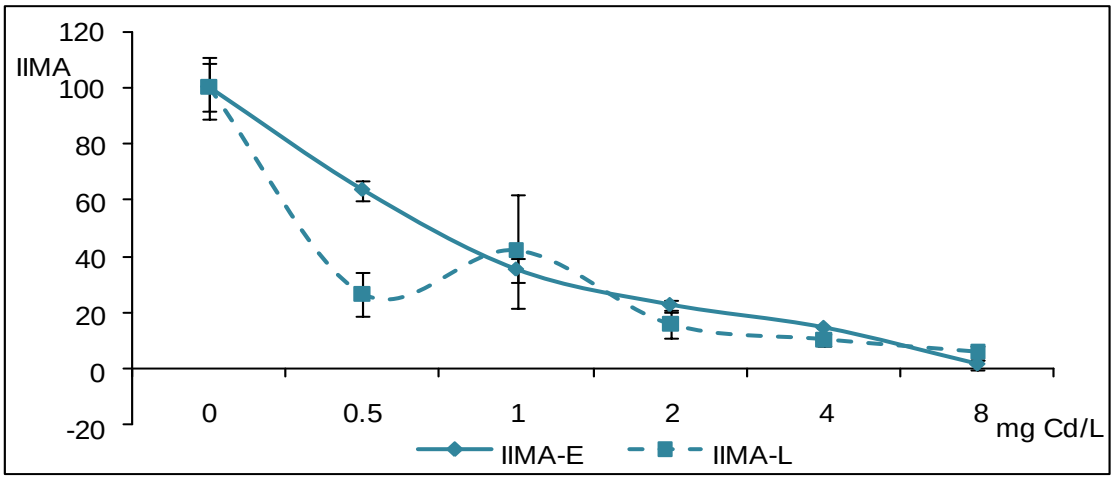

Figura 3.4.4 Efecto del Cd^{+2} en los estadios preparasitarios embriones (E) y larvas (L) a través del IIMA. Se grafica el Índice de Abundancia Media (IIMA) ± ES observados para el control y las concentraciones ensayadas. Valores expresados como media aritmética por tratamiento para IIMA como porcentaje referido al control. En el eje x se expresan las concentraciones de ensayo como valores nominales.

LARVAS

Tanto el DSS, como el Cd y el Cr, no solamente tuvieron efectos severos sobre el desarrollo de *C. nobilii*, sino que también afectaron adversamente la supervivencia larval durante las 48 horas de exposición.

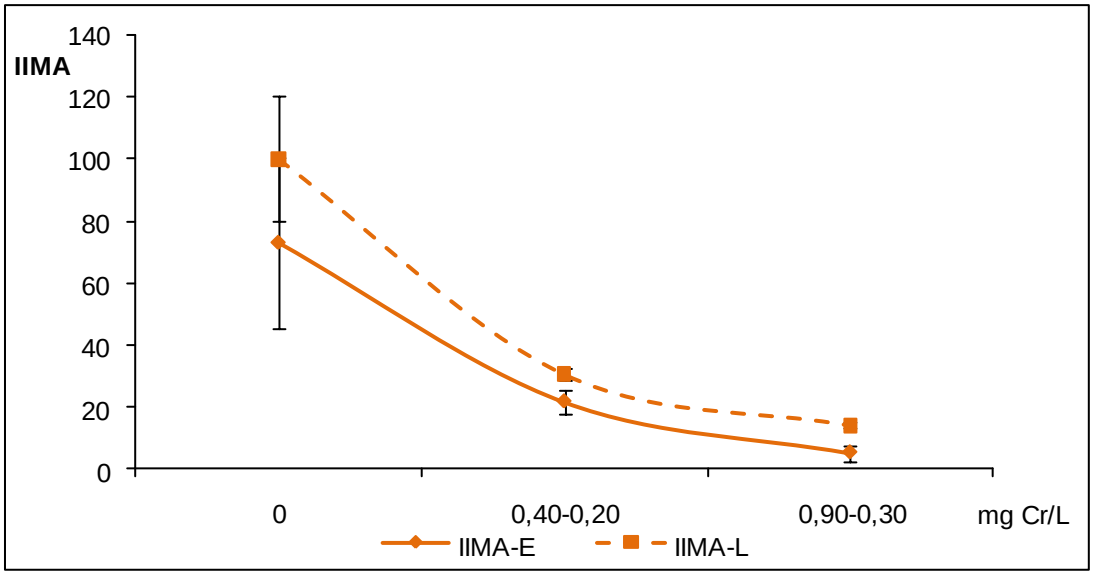

Figura 3.4.5 Efecto del Cr^{+6} en los estadios preparasitarios embriones (E) y larvas (L) a través del IIMA. Se grafica el Índice de Abundancia Media (IIMA) ± ES observados para el control y las concentraciones ensayadas. Valores expresados como media aritmética por tratamiento para IIMA como porcentaje referido al control. En el eje x se expresan las concentraciones de ensayo como valores nominales.

En las figuras 3.4.3, 3.4.4 (página 103) y 3.4.5, se muestra que la supervivencia larval fue afectada significativamente respecto de sus controles para los tres tóxicos (Apéndice II, Tablas 61, 63 página 150 y Tabla 65, página 151).

Solamente el Cr y el DSS mostraron un significativo efecto concentración dependiente (Apéndice II, Tabla 68, página 152).

A partir de los valores de CI_{50}-48h para la variable IIMA-L, se pudo establecer el siguiente orden decreciente de efecto sobre la supervivencia larval: DSS > Cr > Cd (Tabla 3.4.2, página 102), semejante al de embriones.

Si se compara el efecto de los tóxicos entre estadios, podemos considerar que las larvas, son tanto o más sensibles que los embriones (Figuras 3.4.3 y 3.4.4, página 103, y Figura 3.4.5, Tabla 3.4.2, página 102).

Con el fin de desarrollar y validar los protocolos de ensayo es crucial determinar si los puntos finales considerados son indicadores viables de efectos letales y subletales (Lazorchak y col., 2009). En base a los resultados, los puntos finales considerados en esta Tesis parecen ser apropiados para indicar ambos tipos de efecto, letal (IIMA-L y ENV) y subletal (IIMA-E).

Los resultados de esta Tesis validan un protocolo experimental usando los primeros estadios del ciclo de vida de *C. nobilii* para evaluación ecotoxicológica, el que

fue diseñado para simular una situación de exposición aguda. Para evaluar la sensiblidad de embriones, huevos fertilizados de *C. nobilii* fueron expuestos durante un breve periodo de su desarrollo, que representa aproximadamente un 15% del tiempo necesario para que la blástula alcance el estado de larva libre, los embriones completaron su desarrollo en un medio limpio. De manera semejante, el protocolo con larvas incluye un tiempo de exposición más corto, porque las larvas deben encontrar un hospedador dentro de los 7 días de eclosión para poder sobrevivir. Estos dos protocolos permiten evaluar la sensibilidad de este taxón en particular, y el protocolo para desarrollo embrionario es capaz de distinguir efectos subletales (IIMA-E) que de otra manera pasarían desapercibidos.

De acuerdo a Gopalakrishnan y col., (2008), una especie, o al menos un estadio de su ciclo de vida, para ser considerada como organismo prueba en evaluaciones ecotoxicológicas, debe ser no solamente sensible a contaminantes potenciales, sino que también debe colectarse fácilmente en campo (debe ser abundante), además su mantenimiento en laboratorio y cría debe realizarse de manera sencilla. Si las primeras etapas de desarrollo van a ser usadas, el desove debe ser fácilmente inducible y los gametos deber estar disponibles libremente en el medio natural. Según lo citado anteriormente, los estadios preparasitarios de *C. nobilii*, parecen ser apropiados para utilizarse en evaluaciones ecotoxicológicas, aunque nuevas investigaciones deben ser llevadas a cabo para obtener el ciclo de vida completo en laboratorio.

Otro punto para ser tomado en cuenta para considerar a *C. nobilii* como un organismo prueba en evaluaciones ecotoxicológicas es su relativamente alta sensibilidad comparado con otros organismos, como puede observarse en las tablas 3.4.3 - 3.4.5 (páginas 106, 107 y 109). Aunque los puntos finales obtenidos en esta Tesis no son fácilmente comparables con los obtenidos para otras especies, es posible establecer la relativa sensibilidad de *C. nobilii* a los tóxicos ensayados respecto de otros organismos acuáticos.

Tabla 3.4.3. Sensibilidad al DSS para diferentes organismos. CL media (CL_{50}) expresada en mg/L

Especie	***Punto Final***	***Concentración (mg/L)***	***Exposición (hs)***	***Referencias***
Ceriodaphnia dubia	CL_{50}	1.26	48 h	USEPA ECOTOX
Daphnia magna	CL_{50}	1.80	48 h	USEPA ECOTOX
Daphnia ambigua	CL_{50}	2.43	48 h	USEPA ECOTOX
Diaphanosoma brachyurum	CL_{50}	6.14	48 h	USEPA ECOTOX
Daphnia magna	CL_{50}	9.60	48 h	Toussaint y col., 1995
Daphnia pulex	CL_{50}	10.20	48 h	Lewis y Horning II, 1991
Daphnia magna	CL_{50}	10.80	48 h	Lewis y Horning II, 1991
Daphnia pulex	CL_{50}	12.60	48 h	Lewis y Horning II, 1991
Daphnia magna	CL_{50}	13.50	48 h	Lewis y Horning II, 1991
Ceriodaphnia rigaudi	CL_{50}	20.87	48 h	USEPA ECOTOX
Moinodaphnia macleayi	CL_{50}	27.71	48 h	USEPA ECOTOX
Ceriodaphnia dubia	CL_{50}	48.40	48 h	Toussaint y col., 1995
Mysidopsis bahia	CL_{50}	6.60	96 h	Toussaint y col., 1995
Pimephales promelas	CL_{50}	8.00	96 h	Toussaint y col., 1995
Lampsilis teres	CL_{50}	17.00	96 h	USEPA ECOTOX
Utterbackia imbecillis	CL_{50}	22.82	96 h	USEPA ECOTOX
Villosa vibex	CL_{50}	24.00	96 h	USEPA ECOTOX
Utterbackia imbecillis	CL_{50}	30.78	96 h	USEPA ECOTOX
Actinonaias pectorosa	CL_{50}	33.56	96 h	USEPA ECOTOX
Actinonaias pectorosa	CL_{50}	34.38	96 h	USEPA ECOTOX
Utterbackia ibecillis	CL_{50}	40.36	96 h	USEPA ECOTOX

Existen pocos reportes del efecto de los tóxicos referentes sobre otros parásitos, entre los que se pueden mencionar los datos sobre el efecto del Cd y el Cr sobre la supervivencia del trematode *Diplostomum* sp., para el Cd a concentraciones mayores a 20 mg Cd/L la mortalidad en las cercarias expuestas fue significativamente mayor que en el control (Pietrock y col., 2002a), en tanto que para el Cr la mortalidad fue significativa para 2 mg Cr/L (Pietrock y col., 2002b). Con respecto a los nematodos, se puede citar el trabajo de Donkin y Williams (1995), quienes encontraron una LOEC-96h de 11.2 mg Cd^{+2}/L para larvas de *Caenorhabditis elegans*. Para la misma especie, Chu y Chow (2002) determinaron valores de CL_{50}-96h de 12.3 mg Cr^{+6}/L y 21.1 mg Cd^{+2}/L. Murillo y Diaz (1997) expusieron larvas de *Panagrellus redivivus* a diferentes concentraciones de $K_2Cr_2O_7$ como tóxico de referencia, y

obtuvieron una CL_{50}-96h de 44.3 mg Cr^{+6}/L, y EC_{50}-96 para supervivencia, crecimiento y madurez sexual de 38, 39 y 13.2 mg Cr^{+6}/L, respectivamente.

El crustáceo dulceacuícola *Ceriodaphnia dubia* se encuentra entre los organismos más sensibles al DSS (Tabla 3.4.3, página 107), con valores de al menos dos órdenes de magnitud más altos que aquellos requeridos para inducir una respuesta al tóxico en estados preparasitarios de *C. nobilii*.

En lo que respecta al Cd, existe una gran variabilidad en los efectos tóxicos de este metal (Tabla 3.4.4, página 107), dependiendo de los organismos, el medio de dilución y las condiciones del ensayo, y como puede apreciarse, la gran variabilidad se da incluso para la misma especie. En términos generales, la toxicidad es más baja en organismos marinos, mientras que en ambientes dulceacuícolas esta es más baja en vertebrados que en invertebrados, incluso en las etapas tempranas del desarrollo. Si consideramos la CL_{50}, el invertebrado más sensible sería *Hyalella curvispina* en su estado neonato, con una CL_{50}-96h igual a 0.002 mg Cd/L, mientras que la especie más resistente parece ser *Artemia salina*, con una CL_{50}-96h de 160 mg/L. Pero si consideramos los valores de CE_{50}, *Daphnia magna* se encuentra entre los invertebrados de agua dulce más sensibles, con un valor de 0.03 mg Cd/L para una CE_{50}-48h, y el oligoqueto *Tubifex tubifex* es uno de los más resistentes con una CE_{50}-48h de 61.47 mg Cd/L.

En base a los resultados obtenidos en esta Tesis, puede considerarse que los estados preparasitarios de *Chordodes nobilii* poseen una sensibilidad media a baja al Cadmio.

Tabla 3.4.4. Sensibilidad al Cadmio para diferentes organismos. Concentración letal media (CL_{50}) y concentración efectiva media (CE50) expresada en mg/L

Especie	Punto Final	Concentración (mg/L)	Exposición (hs)	Referencias
Hydra vulgaris	LC_{50}	0.31	48 h	USEPA ECOTOX
Tubifex tubifex	EC_{50}	61.47	48 h	USEPA ECOTOX
Tubifex tubifex	LC_{50}	0.03	96h	Bouché y col., 2000
Tubifex tubifex	LC_{50}	0.06	48h	Bouché y col., 2000
Tubifex tubifex	LC_{50}	1.03	96 h	USEPA ECOTOX
Tubifex tubifex	LC_{50}	1.46	48 h	USEPA ECOTOX
Daphnia magna	EC_{50}	0.02	48 h	Barata y col., 2006
Daphnia ambigua	LC_{50}	0.00009	48 h	USEPA ECOTOX
Daphnia pulex	LC_{50}	0.0004	48 h	USEPA ECOTOX
H. curvispina	LC_{50}	0.00171	96 h	García y col., 2010
Daphnia magna	LC_{50}	0.003	48 h	USEPA ECOTOX
Hyalella azteca	LC_{50}	0.008	96 h	Nebeker y col., 1986
Daphnia magna	LC_{50}	0.017	48 h	USEPA ECOTOX

Tabla 3.4.4 (Continuación)

H. curvispina	LC_{50}	0.02999	96 h	García y col., 2010
Daphnia magna	LC_{50}	0.033	48 h	Nebeker y col., 1986
Daphnia magna	LC_{50}	0.038	48 h	Lewis y Horning II, 1991
Daphnia pulex	LC_{50}	0.042	48 h	Lewis y Horning II, 1991
Daphnia magna	LC_{50}	0.069	48 h	USEPA ECOTOX
Ceriodaphnia dubia	LC_{50}	0.100	48 h	USEPA ECOTOX
Ceriodaphnia rigaudi	LC_{50}	0.160	48 h	USEPA ECOTOX
Ceriodaphnia rigaudi	LC_{50}	0.200	48 h	USEPA ECOTOX
Daphnia magna	LC_{50}	0.200	48 h	USEPA ECOTOX
Daphnia magna	LC_{50}	0.36	48 h	Fargasova, 1994
Daphnia magna	LC_{50}	0.520	48 h	USEPA ECOTOX
Cherax destructor	LC_{50}	0.913	48 h	USEPA ECOTOX
Diaphanosoma brachyurum	LC_{50}	1.06	48 h	USEPA ECOTOX
Chironomus riparius	EC_{50}	0.0000145	96 h	USEPA ECOTOX
Chironomus riparius	LC_{50}	0.013	48 h	Iannacone, y col., 2003.
Chironomus calligraphus	LC_{50}	0.132	48 h	Iannacone, y col., 2003.
Chironomus calligraphus	LC_{50}	0.28	48 h	Iannacone, y col., 2003.
Ruditapes decussatus	EC_{50}	0.424	48 h	Beiras y Albentosa, 2004
Mytilus galloprovincialis	EC_{50}	1.925	48 h	Beiras y Albentosa, 2004
Lampsilis teres	LC_{50}	0.011	96 h	USEPA ECOTOX
Villosa vibex	LC_{50}	0.030	96 h	USEPA ECOTOX
Lampsilis teres	LC_{50}	0.038	96 h	USEPA ECOTOX
Actinonaias pectorosa	LC_{50}	0.057	96 h	USEPA ECOTOX

Por último, si comparamos nuestros resultados para el Cr con los mencionados en la literatura (Tabla 3.4.5., página 109), podemos ver que *Ceriodaphnia rigaudi* y *Bosmina longirostris* se encuentran entre los organismos dulceacuícolas más sensibles a este metal, con una CE_{50}-48h igual a 0.002 mg Cr/L y una CL_{50}-96h de 0.05 mg Cr/L, mientras que las larvas de *Panagrellus redivivus* parecen ser las más resistentes, con una CL_{50}-96h igual a 44.3 mg Cr^{+6}/L (Murillo y Diaz, 1997). Comparando los valores de la bibliografía con los obtenidos en los estudios realizados en esta Tesis, *Chordodes nobilii*, con una CI_{50} de 0.71 mg Cr^{+6}/L para el desarrollo embrionario y una CI_{50} de 0.12 mg Cr^{+6}/L para la supervivencia larval, parece encontrarse entre los organismos con una sensibilidad media a alta para este metal.

Tabla 3.4.5. Sensibilidad al Cromo para diferentes organismos. Concentración letal media (CL_{50}) y concentración efectiva media (CE_{50}) expresada en mg/L

Especie	Punto Final	Concentración (mg/L)	Exposición (hs)	Referencias
Cypris subglobosa	EC_{50}	8.75	48 h	Khangarot y Das, 2009
Ceriodaphnia rigaudi	LC_{50}	0.002	48 h	USEPA ECOTOX
Bosmina longirostris	LC_{50}	0.05	96 h	Wu y col., 2007
Daphnia carinata	LC_{50}	0.05	96 h	Wu y col., 2007
Daphnia pulex	LC_{50}	0.06	96 h	Wu y col., 2007
Ceriodaphnia quadrangular	LC_{50}	0.07	96 h	Wu y col. , 2007
Simocephalus vetulus	LC_{50}	0.08	96 h	Wu y col., 2007
Daphnia carinata	LC_{50}	0.12	48 h	Wu y col., 2007
B. longirostris	LC_{50}	0.12	48 h	Wu y col., 2007
C. quadrangular	LC_{50}	0.14	48 h	Wu y col., 2007
D. pulex	LC_{50}	0.15	48 h	Wu y col., 2007
S. vetulus	LC_{50}	0.16	48 h	Wu y col., 2007
Daphnia magna	LC_{50}	0.25	96 h	Wu y col., 2007
D. magna	LC_{50}	0.78	48 h	Wu y col., 2007
Bryocamptus echinatus	LC_{50}	1.26	96 h	USEPA ECOTOX
Bryocamptus zschokkei	LC_{50}	1.85	96 h	USEPA ECOTOX
Bryocamptus pygmaeus	LC_{50}	3.48	96 h	USEPA ECOTOX
Bryocamptus minutus	LC_{50}	3.56	96 h	USEPA ECOTOX
Attheyella crassa	LC_{50}	3.82	96 h	USEPA ECOTOX
Diplodon chilensis	LC_{50}	20.40	96 h	Silva y col., 2007

Los protocolos de ensayo diseñados dan puntos finales letales (ENV e IIMA-L) y subletales (IIMA-E) adecuados para *C. nobilii*, que en base a las respuestas a DSS, Cr y Cd, puede caracterizarse como una especie de sensibilidad media a alta en relación a otros organismos acuáticos.

Dentro de la evaluación de la toxicidad de sustancias sobre especies parásitas, se han realizado diferentes estudios, algunos de sus resultados sugieren que las membranas de los huevos son barreras efectivas contra los poluentes, pero su eficiencia ha sido cuestionada en otros casos. Los experimentos realizados para resolver esta pregunta deben ser fáciles de realizar en el laboratorio (Pietrock y col., 2003). Los protocolos desarrollados para *C. nobilii* son fáciles de llevar a cabo en un laboratorio, y permitirían evaluar este punto.

En relación al diseño experimental protocolizado, la extensión en el tiempo sería uno de los puntos a discutir. Mientras que el protocolo para desarrollo

embrionario tiene una duración prolongada (de aproximadamente 1 mes), el destinado a supervivencia larval comprende solo 5 días. Por consiguiente, éste último sería el más apropiado para evaluaciones ecostoxicológias de rutina.

Por útlimo, es interesante destacar que ninguno de los bioensayos requiere equipamiento especial; siendo el protocolo experimental reproducible.

CAPÍTULO V
EXPOSICIÓN A TEMPERATURAS EXTREMAS

INTRODUCCIÓN

La temperatura es una de las variables de mayor influencia en todos los procesos vitales y en todos los niveles de complejidad biológica. El aumento de la temperatura acelera las reacciones metabólicas que gastan energía, permitiendo incrementar la actividad, crecimiento, desarrollo y reproducción.

En el caso de los endoparásitos, durante su fase de vida libre pueden sobrevivir en un amplio rango de temperaturas, a veces a 40ºC. Cuando la temperatura cae por debajo o sobrepasa un límite térmico específico de cada especie, la fase de vida libre no sobrevive. Distintos estudios revelaron un patrón general en los diferentes filums: las bajas temperaturas en el ambiente pueden prolongar la vida útil de los estadios de vida libre de los helmintos parásitos, mientras que las altas temperaturas aceleran el desarrollo individual y de esa manera la longevidad se acorta. La supervivencia puede disminuir al aumentar la temperatura, sobre todo para las fases de vida libre que no se alimentan (por ejemplo, huevos, quistes, larvas). La supervivencia de los quistes disminuye con la exposición prolongada a temperaturas cálidas porque el aumento del metabolismo drena las reservas de energía de los quistes (Lafferty, 2009; Pietrock y col., 2003).

Los efectos de temperatura sobre la infectividad o capacidad infectiva de los estadios de vida libre se pueden resumir en cuatro generalizaciones: (1) la temperatura a la que la infectividad es más alta no se corresponden necesariamente con la temperatura en la que la supervivencia del estadio infectante es mayor; (2) una pérdida de la infectividad o la reducción del período de infectividad puede ser generado tanto por un aumento como por una disminución de la temperatura; (3) el período en el cual la fase de vida libre es capaz de infectar es generalmente más corto que su vida útil máxima, y la reducción de la longevidad va de la mano con una reducción en el periodo infeccioso, y, (4) en un ciclo de vida un estadio protegido por una cáscara de huevo, quiste o cutícula, como en los nematodos, pueden mantener su infectividad en las temperaturas extremas a diferencia de etapas sin protección (Pietrock y col., 2003).

Los cambios estacionales de la temperatura pueden alcanzar límites extremos, desde temperaturas bajo cero en invierno, a temperaturas muy altas en verano, que

pueden sobrepasar los 40ºC, impactando probablemente sobre los ambientes de agua dulce, generando mayores efectos sobre cuerpos de agua someros, en los que normalmente se encuentran individuos de la clase Gordiida (Hanelt y col., 2005). Aunque se han realizado varios estudios sobre el complejo ciclo de vida de los Gordiida (Bolek y Coggins, 2002; Hanelt y Janovy, 2003, 2004; de Villalobos y col., 2003; Schmidt-Rhaesa, 2001, 2002; Zanca y col., 2007), la información acerca de su ecología o fisiología sigue siendo escasa (Bolek y Coggins, 2002; Chandler, 1985; Schmidt-Rhaesa, 1997; Swanson, 1982).

La temperatura es uno de los principales factores que influyen sobre el desarrollo de los distintos organismos, y varios autores han realizado estudios, con resultados disímiles de la tolerancia a la temperatura en distintas especies de Gordiida (Camerano, 1897; Dorier, 1925, 1930; y Zanca y col., 2007).

Considerando la escasa información existente sobre el efecto de la temperatura en este grupo, es importante conocer como afecta esta variable a los distintos estadios de vida libre de *Chordodes nobilii*.

El **objetivo** en este capítulo es evaluar el efecto de temperaturas extremas sobre los estadios de vida libre de *C. nobilii*.

En el capítulo II, de la sección II (página 58), se describió el protocolo seguido para la realización de los ensayos que evalúan tolerancia térmica. En la tabla 3.5.1 se muestran las temperaturas a las cuales se expusieron los estadios de vida libre de *C. nobilii*.

Tabla 3.5.1: Temperaturas evaluadas en los bioensayos para cada estadio de vida libre de *C. nobilii*.

Estadio	***Temperatura evaluada (ºC)***
Desarrollo embrionario	-3
	40.5
Larvas	-3
	40.5
Adultos	-3
	38.5
	40.5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EMBRIONES

Los huevos expuestos a ambas temperaturas extremas durante 96 horas no mostraron signos de avance del desarrollo durante el periodo de postexposición de 30 días. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que tanto a 40.5ºC como a la temperatura de congelamiento el desarrollo embrionario se inhibe completamente.

En ambos tratamientos la observación microscópica permitió la identificación de huevos dañados (ruptura de la membranas de los huevos, retracción de los embriones) (Figura 3.5.1). El grupo control continuó el desarrollo embrionario normalmente, con más del 50% de las larvas eclosionadas a los 30 días post exposición.

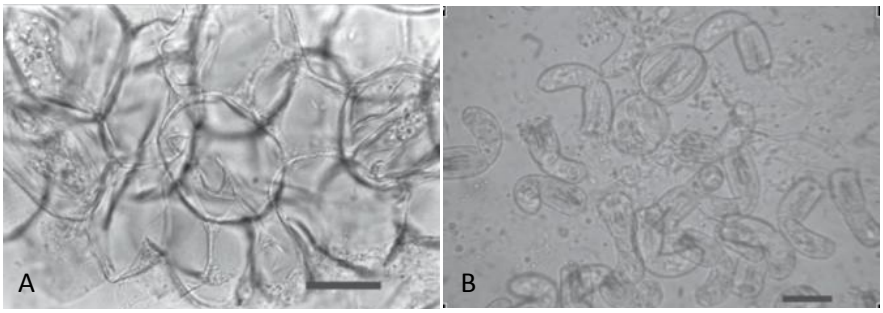

Figura 3.5.1. A) Embriones No Viables observados en las muestras expuestas a las temperaturas extremas. B) Larvas libres y larvas en huevo para el control. La barra de escala en ambas figuras es igual a 15 µm

LARVAS

El bioensayo llevado a cabo con larvas mostró que la supervivencia larval fue significativamente disminuida luego de la exposición a las temperaturas extremas (Figura 3.5.2, página 114). Tanto las larvas expuestas a -3ºC como aquellas expuestas a 40.5ºC se diferencian entre ellas y del control siendo más agudo el efecto de 40.5ºC (Apéndice II, Tablas 66 y 67, página 151).

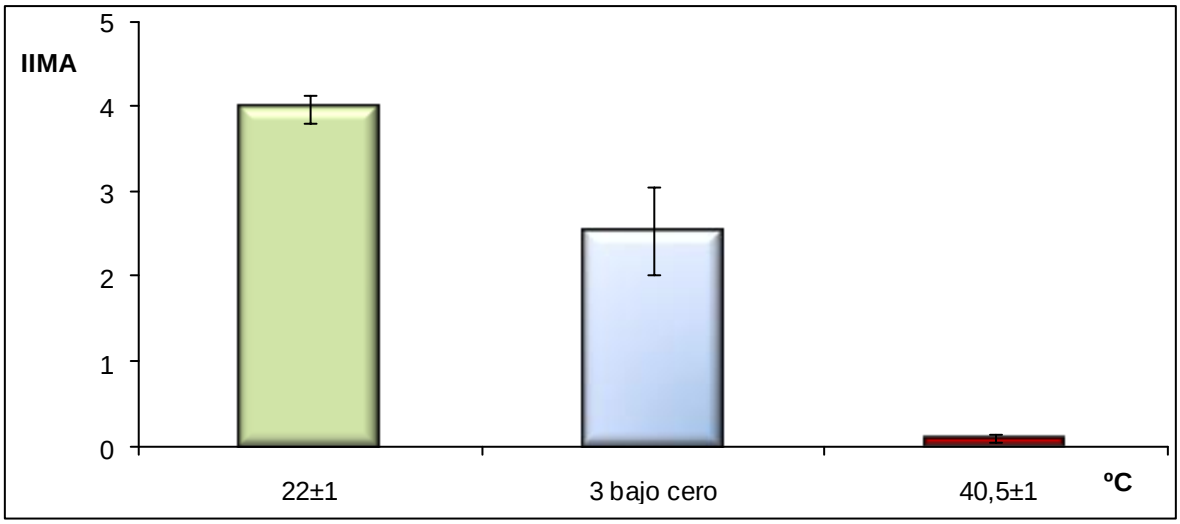

Figura 3.5.2. Larvas expuestas a 40.5 ºC y a -3 ºC. Se grafica el IIMA como media aritmética ± ES, observados para el control y las temperaturas ensayadas.

ADULTOS

En los estudios que evaluaron la sensibilidad de adultos, se demostró que la exposición a temperaturas de -3ºC, el 28% de los mismos recobra su movilidad luego de 5 días post exposición. Luego de 7 días solamente el 11% de los especímenes mantiene la movilidad (Figura 3.5.3). El grupo control mantiene los movimientos normales durante el periodo de exposición y durante los 7 días de post exposición.

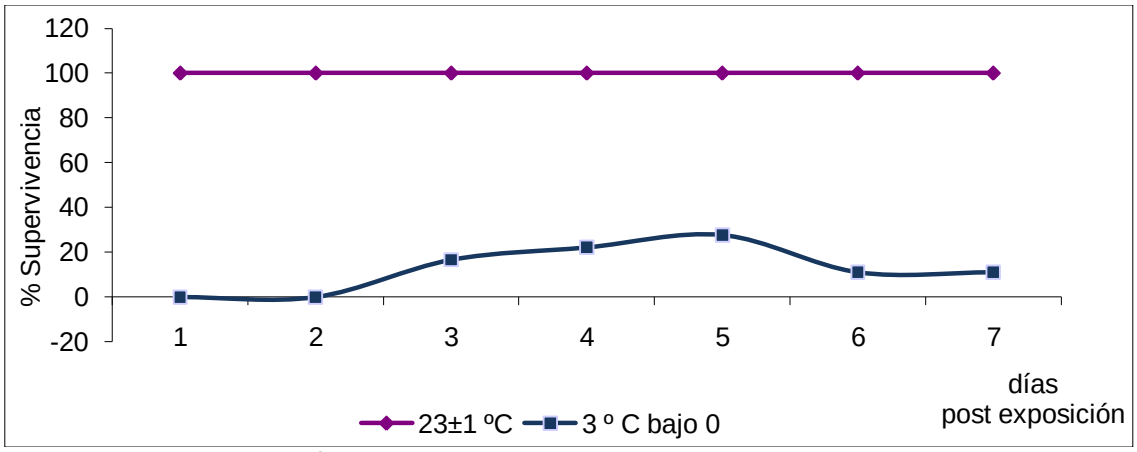

Figura 3.5.3. Postexposición de los adultos expuestos a temperaturas bajo cero. La temperatura a la que se mantuvo al grupo control fue 23±1 ºC. En el eje Y se observa el porcentaje de supervivencia de los individuos expuestos. En el eje X se observa el tiempo de postexposición.

Durante la exposición de los adultos a 38.5 ºC por 96 horas se observa que los especímenes se hallan inmóviles, formando nudos, pero luego de 10 minutos a

temperatura ambiente estos recobran su actividad normal. La mortalidad dentro del grupo expuesto es del 10%, y no es significativa respecto del control. Cuando la Tº se aumenta a continuación a 40.5 ºC, la mortalidad se incrementa al 50% luego de 24 horas de exposición, alcanzando el 100% al finalizar el ensayo (96 horas), (Figura 3.5.4). La temperatura letal media (TL_{50}) por tanto se encuentra entre los 38.5 y los 40.5 ºC.

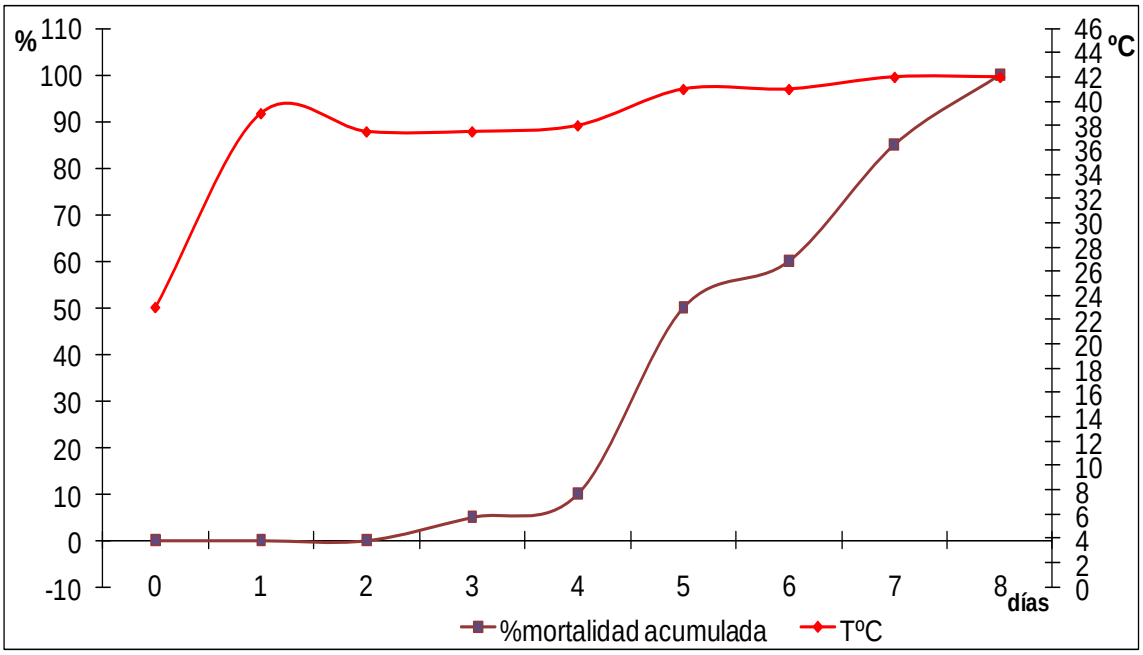

Figura 3.5.4. Exposición de adultos a temperaturas de 38.5 y 40.5 ºC. Temperatura de control 23±1 ºC. Valores representados como porcentaje de mortalidad acumulada. En los ejes Y se observan el porcentaje de mortalidad acumulado de los individuos expuestos (a la derecha) y la temperatura (a la izquierda). En el eje X se observa el tiempo de exposición expresado en días.

Zanca y col., (2007) observaron que huevos de *C. nobilii* mantenidos a 5 ºC, luego de la elevación de la temperatura, continúan con el desarrollo embrionario normal. Estos autores plantean que las larvas, en su medio natural durante el invierno, retardan su eclosión, y se mantienen dentro de las cubiertas del huevo, como una estrategia de supervivencia hasta que los posibles hospedadores estén nuevamente disponibles. El efecto de la temperatura sobre la movilidad de las larvas de nematomorfos fue estudiado en *Gordius aquaticus* por Dorier (1930), quien observó que la mortalidad para las larvas expuestas a 37ºC durante 30 horas alcanzó el 100%. Las larvas de *Chordodes nobilii* también demostraron ser sensibles a la exposición a temperaturas elevadas, ya que luego de 48 h de exposición a 40.5 ºC la mortalidad fue casi total, alcanzando el IIMA un valor de 0.09 (Figura 3.5.2, página 114).

En esta Tesis se reporta el primer resultado de exposición de larvas a temperaturas bajo cero, determinándose que aunque las larvas pudieron realizar infecciones, el IIMA fue significativamente menor que el control. A pesar de que la temperatura de congelamiento genera un efecto negativo sobre la supervivencia larval, es probable que el ciclo de vida pueda mantenerse durante inviernos muy fríos, en tanto que las temperaturas extremas superiores determinarían una interrupción del mismo.

Respecto de los adultos, Camerano realizó estudios de tolerancia térmica en especímenes de *Gordius aquaticus, Parachordodes tolosanus* y *P. pustulosus*, los que mostraron una disminución de la movilidad cuando la temperatura del medio es de 25ºC, inmovilidad a 39ºC y letalidad del 100% a 44-46 ºC. Dorier (1930) realizó estudios con *Gordionus violaceus*, *G. aquaticus* y *Parachordodes gemmatus*, y encontró que luego de tres días de exposición a 37ºC los especímenes expuestos de *Gordionus violaceus* murieron, mientras que los especímenes de *G. aquaticus* y *Parachordodes gemmatus*, murieron luego de 7-9 días. Los resultados obtenidos en esta Tesis sobre la respuesta de los adultos de *C. nobilii* a temperaturas que exceden los 38.5ºC demuestran que la tolerancia se ve disminuida significativamente. Por tanto, *C. nobilii* resultaría tan o más resistente que *Gordius aquaticus, Parachordodes tolosanus P. gemmatus* y *P. pustulosus*, y más resistentes que *Gordionus violaceus*.

Finalmente, se puede concluir que los estadios de vida libre de *Chordodes nobilii* son susceptibles a las temperaturas extremas, pero mientras que a temperaturas bajo cero puede observarse un cierto grado de supervivencia, la temperatura de 40.5 ºC es letal.

SECCIÓN IV

DISCUSIÓN FINAL Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN FINAL

Obtención de una línea de base para la capacidad infectiva de esta especie.

El éxito de la infección es crucial para la supervivencia de los parásitos, y los gordiidos no escapan a esta consigna. En este grupo las larvas que logran eclosionar son las que tendrían la capacidad de realizar las infecciones, y la viabilidad estará dada por el éxito en la infección.

Por lo tanto, es crucial que las larvas al eclosionar sean capaces de infectar a hospedadores potenciales. Precisamente sobre la base de esta característica biológica se fundamentó el diseño de los protocolos de ensayo.

Es imprescindible contar con información suficiente y confiable acerca de la capacidad infectiva de las larvas de *Chordodes nobilii* en situación control a fin de poder interpretar, sin subestimar ni realizar sobreestimaciones, la respuesta de las etapas preparasitarias en situaciones de estrés. Con esta finalidad se construyó la *línea de base* de potencialidad infectiva de las larvas de *C. nobilii* en condiciones controladas de laboratorio. Los resultados obtenidos (Sección III, Capítulo I) demuestran que la capacidad infectiva de esta especie presenta una gran variabilidad. La principal fuente de variabilidad corresponde a la hembra que realizó la puesta, por lo cual se podría presuponer un factor primordialmente genético si bien no se pueden descartar la influencia de otras variables como el estado metabólico general.

La potencialidad génica, dada por la hembra y los machos que participan en la fecundación de los huevos sería un factor principal al momento de determinar el éxito de las larvas al realizar las infecciones. Este descubrimiento tiene gran importancia, ya que se podría vincular este hecho con el éxito reproductivo de la especie a nivel de fecundidad y viabilidad de la progenie. Sin embargo tomando en consideración que los resultados se basan en datos obtenidos durante 4 años, a partir de hembras colectadas en el medio, no se puede desestimar el efecto de variables ambientales a las que estuvieron expuestas las hembras previamente. Por consiguiente, se deben realizar más estudios para evaluar la capacidad reproductiva de la especie, y comparar el éxito reproductivo de *C. nobilii* con otras especies de gordiidos.

Diseño del protocolo de ensayo adecuado para los Gordiida, selección de los puntos finales.

Al momento de iniciar el diseño de los protocolos a utilizar para evaluar la sensibilidad de este grupo a distintos factores se consideraron las características biológicas de los organismos y la bibliografía disponible sobre el tema.

En los sistemas naturales la toxicidad aguda que experimentan los organismos es producida, generalmente, por descargas de contaminantes al medio, ocurridas accidentalmente, o, que alcanzan el cuerpo de agua por escorrentía luego de precipitaciones en un periodo de tiempo determinado, por lo tanto la exposición es puntual y de corta duración, y la misma puede tener efectos dañinos a largo plazo.

A partir de estos antecedentes los protocolos utilizados en esta Tesis se diseñaron para simular una situación de exposición aguda. En el caso de los embriones, estos fueron expuestos durante 96 horas aproximadamente un 15% del tiempo que le lleva a los mismos alcanzar el estado de larva libre. En tanto que, para las larvas que deben encontrar un hospedador para poder sobrevivir dentro de aproximadamente los 7 días de eclosión, el tiempo de exposición empleado (48 horas) fue de aproximadamente un 30% del que necesitan para hallar al hospedador. En ambos casos los tiempos de exposición son comparables con los utilizados, en general, para bioensayos de exposición aguda en otros animales.

En la evaluación de riesgo de los agentes químicos es necesario tener información acerca de la letalidad en etapas iniciales del ciclo de vida en una especie, pero el criterio mayormente usado no evalúa a los embriones que lograron eclosionar y sobrevivir al periodo de exposición. Este hecho ha sido planteado por autores como Fraysse y col. (2006). Anteriormente, von Westernhagen (1988), resaltó el hecho de que *"la eclosión viable"* es un indicador más sensible de los efectos de los poluentes que *"la eclosionabilidad"*. Por tanto, la determinación de eclosiones viables podría ser más relevante para evaluar los efectos subletales de poluentes (Fraysse y col., 2006).

La supervivencia de los organismos evaluados, es, sin lugar a duda, un parámetro importante. Sin embargo, en un organismo parásito, siempre que sea posible, la atención debe dirigirse a la capacidad de realizar infecciones, ya que existen datos indicando que es un parámetro más sensible y es afectado antes que la viabilidad por la presencia de

poluentes (Pietrock y col., 2003). La capacidad infectiva de los parásitos se encontraría dentro de las eclosiones viables postuladas anteriormente.

Compartiendo la opinión de Fraysse y col., (2006), de Pietrock y col., (2003), y de von Westernhagen (1988), en esta Tesis se consideró como punto final la capacidad infectiva de las larvas eclosionadas de los huevos expuestos, evaluada mediante un índice de infección, el IIMA-E. Ya que aunque las larvas de *C. nobilii* lograron eclosionar luego de una exposición, este hecho no implica necesariamente que los embriones no fueran afectados.

Es de destacar que en el caso de bioensayos con embriones, el IIMA-E permitió descubrir un efecto subletal que podría pasar desapercibido de otro modo, ya que en la mayoría de los bioensayos llevados a cabo no se observaron malformaciones en las larvas eclosionadas ni ninguna característica observable a microscopio óptico que permitiera suponer que el desarrollo embrionario se había visto perjudicado por los tóxicos ensayados.

Los puntos finales obtenidos en esta Tesis en base a la capacidad infectiva no fueron fácilmente comparables con los obtenidos para otras especies no parásitas, pero permitieron establecer la sensibilidad de *C. nobilii* para un tóxico dado respecto de otros organismos, ya que fue posible obtener a partir de ellos una concentración de efecto que, podrían ser de utilidad para el uso con otras especies parásitas. Finalmente, un tema importante a tener en cuenta es que estos puntos finales pueden ser considerados confiables y válidos para ser usados en evaluaciones ecotoxicológicas en estados preparasitarios de especies de Gordiida.

Los análisis de los resultados de bioensayos embriotoxicológicos se basan en estimar la frecuencia y la intensidad de las anormalidades observadas lo cual conlleva a que los resultados obtenidos estén teñidos por la subjetividad del observador (Fraysse y col., 2006). Considerando este hecho, el protocolo desarrollado para *C. nobilii* habilita el análisis de un punto final distinto, el cual permitiría que la comparación de los resultados obtenidos a partir de bioensayos realizados en distintos laboratorios, pueda realizarse con mayor objetividad, utilizando como punto final la capacidad infectiva analizada mediante un índice (IIMA-E e IIMA-L).

Por último, los resultados de esta Tesis validan los protocolos experimentales diseñados y desarrollados, en los que se usan los estadios preparasitarios del ciclo de vida de *C. nobilii*, para evaluación ecotoxicológica.

Evaluación mediante bioensayos del efecto de contaminantes sobre *Chordodes nobilii*.

Un resumen de los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental de esta Tesis se da en la tabla 4.1.1 (página 121). La lectura detallada de estos resultados pone en evidencia el grado de sensibilidad a los diferentes tóxicos de *Chordodes nobilii* en los primeros estadios de vida.

Dos de los tóxicos referentes evaluados, el DSS y el Cd, y los tres plaguicidas, el Glifosato, el Carbendazim y el Malatión no inhibieron el desarrollo embrionario cuando el medio de ensayo fue agua reconstituida. De estos tóxicos, solamente el Malatión, en la máxima concentración ensayada, generó un aumento significativo del número de embriones no viables (ENV).

Solo el Carbendazim, en medio natural, y el cromo, en agua reconstiutida, determinaron inhibición del desarrollo embrionario, con una CI_{50}-96 h de 0.032 y 0.71 mg/L, respectivamente. Considerando estos resultados se puede decir que a concentraciones que se encontraban en el mismo orden de magnitud, el fungicida fue más tóxico que el Cromo.

De los tóxicos evaluados el Cromo y el Malatión generaron malformaciones. En el caso del insecticida, la concentración en la cual se hicieron evidentes las malformaciones, fue la misma en la que se determinó la inviabilidad total de las larvas eclosionadas de huevos expuestos (IIMA-E = 0).

La mínima concentración que generó efecto tanto sobre el desarrollo embrionario (al considerar el IIMA-E) como sobre el estadio larval, fue la mínima concentración ensayada, salvo para el Glifosato y el Malatión, en ambos casos cuando el medio de ensayo fue agua del medio natural.

Tabla 4.1.1. Resumen de los resultados obtenidos a partir de los bioensayos realizados con tóxicos en esta Tesis.

Tóxico	**Medio ensayo**	**Bioensayo**	**Punto final**	**Concentraciones analíticas (mg/L)**		
				Mínima concentración ensayada	**Mínima concentración que causó efecto**	**CI_{50}**
Glifosato i.a.	EPA	Embriones	ENV	0.08	---	---
			IIMA-E		0.08	0.045
		Larvas	IIMA-L	0.08	0.08	0.501
Glifosato F.	EPA	Embriones	ENV	0.07	---	---
			IIMA-E		0.07	0.054
		Larvas	IIMA-L	0.07	0.07	0.067
Glifosato F.	SG	Embriones	ENV	0.07	---	---
			IIMA-E		0.74	0.570
		Larvas	IIMA-L	0.08	0.08	0.357
Carbendazim	EPA	Embriones	ENV	0.011	---	---
			IIMA-E		0.011	0.007
		Larvas	IIMA-L	0.009	0.009	0.011
Carbendazim	SG	Embriones	ENV	0.011	0.044	0.032
			IIMA-E		0.011	0.011
		Larvas	IIMA-L	0.009	0.009	0.028
Malatión	EPA	Embriones	ENV	0.036	0.219	---
			IIMA-E		0.036	0.030
		Larvas	IIMA-L	0.036	0.036	0.019
Malatión	SG	Embriones	ENV	0.036	----	---
			IIMA-E	0.036	0.054	0.031
		Larvas	IIMA-L	0.078	0.078	0.089
DSS	EPA	Embriones	ENV	0.12	---	---
			IIMA-E		0.12	0.064
		Larvas	IIMA-L	0.1	0.1	0.061
Cd	EPA	Embriones	ENV	0.4	---	---
			IIMA-E		0.4	0.63
		Larvas	IIMA-L	0.4	0.4	0.36
Cr	EPA	Embriones	ENV	0.4	0.9	0.71
			IIMA-E		0.4	0.29
		Larvas	IIMA-L	0.16	0.16	0.12

Un punto interesante a tener en cuenta es que, en un rango de incremento de concentración relativamente pequeño, se produjo un efecto tóxico significativo. Este hecho se aprecia en aquellos puntos finales donde el tóxico generó efecto a concentraciones mayores que la mínima ensayada, como fueron los casos de los plaguicidas, en medio natural, y del Cromo. A su vez, estas concentraciones de efecto fueron mayores que la CI_{50} obtenida. Todos estos casos se dieron en el desarrollo embrionario. Por consiguiente, el umbral a partir del cual los embriones pueden ser

afectados es muy estrecho, y consecuentemente, deben considerarse cautelosamente los rangos de concentración en los que los embriones pueden desarrollarse exitosamente.

En función de la CI_{50}-96 (mg/L) para la variable IIMA-E, se pudieron clasificar los tóxicos evaluados en orden decreciente de toxicidad de la siguiente manera (el subíndice indica si el medio es agua reconstituida (E.) y/o agua del medio natural (S):

$Carbendazim_E$ (0.007) > $Carbendazim_S$ (0.011) > $Malation_{E-S}$ (0.03) > Glifosato i.a. (0.045) > Glifosato F_E (0.054) > DSS (0.064) > Cr (0.29) > Glifosato F_S (0.570) > Cd (0.63).

Para el estadio larval, en función de la CI_{50}-48 (mg/L) se pudieron ordenar los tóxicos evaluados en forma decreciente según su efecto de la siguiente manera (el subíndice indica si el medio es agua reconstituida (E.) o agua del medio natural (SG):

$Carbendazim_E$ (0.011) > $Malation_E$ (0.019) > $Carbendazim_S$ (0.028) > Cr (0.12) > Cd (0.36) > DSS (0.061) > Glifosato F_E (0.067) > $Malation_S$ (0.089) > GlifosatoF_S (0.357) > Glifosato IA (0.501)

Para los embriones, se pudo observar que los plaguicidas resultaron más tóxicos que el detergente y los metales, salvo para el Glifosato en medio natural; en cambio para las larvas, los metales y el detergente fueron más tóxicos que el Glifosato y que el Malatión en medio natural.

Para los embriones el poluente que generó un efecto menor fue el Cd, en tanto que para las larvas fue el Glifosato como ingrediente activo.

Se determinó que el Carbendazim, cuando el medio de ensayo fue agua reconstituida, resultó ser el contaminante más tóxico para ambos estadios.

Finalmente, si se considera el efecto del medio sobre la sensibilidad de *C. nobilii* a los plaguicidas, se estableció que el medio no necesariamente disminuye el efecto de los pesticidas.

En vista que para el Malatión y el Carbendazim el medio de dilución afectó la toxicidad y que esta se encuadra en valores esperables en el ambiente la información obtenida puede considerarse un alerta acerca de los niveles guía establecidos para la protección de la biota acuática

Establecimiento del rango de tolerancia térmica en las etapas de vida libre de *Chordodes nobilii*.

Luego de la evaluación del efecto de las temperaturas extremas sobre los estadios tempranos de desarrollo de *Chordodes nobilii* se puede concluir que son susceptibles a estas, evidenciándose mayor tolerancia a las temperaturas de congelamiento.

Lo mismo puede plantearse para los adultos, considerándose también que un aumento de dos grados, de 38.5 a 40.5 °C, genera una letalidad del 50% en 24 horas, encontrándose la temperatura letal media dentro de éste rango estrecho.

Determinación de la capacidad de *C. nobilii* de actuar como bioindicadora de contaminación.

Existen varios autores, entre ellos Lafferty (1997), Mackenzie (1999) y Sures (1999, 2004), que abogan por el uso de los parásitos en evaluaciones de calidad de ambiente.

Se ha comprobado que el número de digeneos, cestodes y acanthocephalos, que tienen ciclos de vida indirectos complejos, como los Gordiida, disminuye con la mayoría de los tipos de contaminación (Mackenzie, 1999), demostrando que estos parásitos son sensibles a la polución.

Dentro de los estudios llevados a cabo con especies de parásito, la mayoría se han realizado con miracidios o cercarias. El conocimiento acerca de los efectos de tóxicos sobre huevos y larvas de cestodes, digeneos y nematodos es escaso (Pietrock y col., 2003). Por tanto se necesita información acerca de la respuesta a los poluentes de otros taxas de endoparásitos de los que se carece de referencia, como es el caso de los Nematomorpha.

Ya sean organismos de vida libre o parásitos, se considera que una especie o al menos un estadio de su ciclo de vida, debe cumplir con una serie de requisitos para que sea considerada como “especie sensible”. Entre ellos se mencionan: tener una amplia distribución geográfica, tener tamaño suficientemente grande (es conveniente en el trabajo experimental); ser comunes; ser sensibles a la contaminación y tolerantes a un amplio intervalo de condiciones ambientales, deben colectarse fácilmente en campo y de

fácil disponibilidad (debe ser abundante), además su mantenimiento en laboratorio y cría debe realizarse de manera sencilla. Si las primeras etapas de desarrollo van a ser usadas, el desove debe ser fácilmente inducible y los gametos deben estar disponibles libremente en el medio natural (Espina y Vanegas, 2005; Gopalakrishnan y col., 2008). Otros investigadores proponen que la selección debe basarse en especies claves dentro de la organización de la comunidad, o, por su participación como enlaces en las cadenas tróficas que conducen a sus consumidores de importancia económica (Espina y Vanegas, 2005). Un listado de los requisitos necesarios para ser considerada bioindicadora se muestra en la Tabla 4.1.2

Existe discrepancia en cuanto a si se deben considerar a las especies ampliamente tolerantes a cambios en las variables ambientales como especies indicadoras o no. Por un lado, se argumenta que dicha tolerancia podría preadaptar a los organismos para resistir el estrés de la contaminación y por lo tanto no serían adecuadas. En contraste, el otro argumento plantea que, las especies más sensibles serían aquellas que en condiciones naturales experimentan estrés y por lo tanto sucumbirían rápidamente al nuevo estrés impuesto por el contaminante. En esta tesis se adhiere al segundo argumento. Se considera que si una especie puede tolerar rangos amplios de variación de los factores ambientales, una disminución en su población probablemente esté mucho más relacionada con factores antrópicos que naturales.

Finalmente, seleccionar organismos complementarios que representen distintos sectores del ecosistema es importante para disminuir la probabilidad de que no se detecte un impacto, razón por la cual es esencial contar con especies autóctonas. Existen especies que se consideran estandarizadas para este tipo de evaluaciones, la mayoría pertenecientes al hemisferio norte, que no necesariamente puedan reflejar los cambios que ocurren en un ambiente dado. La proposición del uso de especies nativas, las cuales pueden ser mucho más adecuadas para obtener información acerca de un sitio específico, ha sido propuesta desde hace ya muchos años por Buikerma y col., 1982.

En lo referente al control de la contaminación, se debe considerar que buscar métodos o especies estándares, que sirvan para identificar los efectos de los contaminantes sobre todas las especies en todos los ambientes, es muy poco realista. Cada investigador debiera seleccionar el organismo adecuado para su tipo de estudio y acorde a sus objetivos, sin olvidar que existen especies, poblaciones y enlaces entre las cadenas alimentarias, particularmente sensibles a los contaminantes. También es

necesario recordar que no todas las pruebas sirven a todo propósito de igual manera (Espina y Vanegas, 2005).

Tabla 4.1.2. Requisitos de una especie bioindicadora de contaminación y su estado en *Chordodes nobilii*.

Características	**Especie sensible**	***Chordodes nobilii***
Abundancia	Grande	Son abundantes
Disponibilidad de adultos reproductores	Alta	Alta
Disponibilidad de puestas en campo	Alta	Alta
Distribución geográfica	Amplia	Amplia
Tolerancia a condiciones ambientales	Amplia	Hasta ahora comprobada la tolerancia a la temperatura solamente
Importancia	Ecológica y Económica	Ecológica
Respuestas a tóxicos	Sensibles	Sensibles
Formas-Estadios	Estadios de desarrollo tempranos Facilidad de manejo	Fácilmente manejables
Papel ecológico	Productores primarios, Organismos de enlace	Organismos de enlace en las redes tróficas y entre ambientes terrestre y dulceacuícola
Mantenimiento en laboratorio	Fácil	Todos los estadios de vida libre se mantienen fácilmente en laboratorio
Conocimiento acerca de biología, ecología y fisiología	De los principales aspectos	Escaso
Reproducción y cría en laboratorio	Alta	No se ha desarrollado aún
Susceptibilidad a enfermedades y parásitos	Conocida	No se conoce
Relación filogenética y ecológica, además de otras similitudes con las especies recomendadas por la USEPA y otros organismos oficiales	Conocida	No posee - No se conoce
Relación con el hombre	Por medio de la cadena trófica o por su parentesco o por relación filogenética	Parásitos de insectos de interés agronómico-médico

De los 15 requisitos que se mencionan en la tabla anterior, que una especie sensible debe poseer, *Chordodes nobilii* presenta 10. De los restantes, la tolerancia a

condiciones ambientales, el conocimiento acerca de la biología, ecología y fisiología; y, la reproducción y cría en laboratorio; los estudios recién comienzan a desarrollarse. Hasta ahora se ha comprobado que *C. nobilii* tiene un amplio rango de tolerancia térmica (resultados obtenidos en esta Tesis; Zanca y col., 2007), y se han realizado crías en laboratorio exitosas para otras especies de la clase Gordiida (Hanelt y Janovy, 2004). También se están realizando trabajos de investigación sobre la ecología de diversas especies, tanto del hemisferio norte como en Argentina (de Villalobos y col., 2003a; de Villalobos y Ronderos, 2003; Hanelt y Janovy, 2003; Hanelt y Janovy, 2004; Salas y col., 2008, 2010).

Durante el desarrollo de ésta tesis se han publicado los primeros trabajos ecotoxicológicos sobre *C. nobilii* (Apéndice III, página 154).

De acuerdo a lo citado anteriormente, los estadios preparasitarios de *C. nobilii*, parecen ser apropiados para utilizarse en evaluaciones ecotoxicológicas, aunque nuevas investigaciones deben ser llevadas a cabo para optimizar la obtención del ciclo de vida completo, entre otras.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos durante el periodo experimental llevado a cabo para esta Tesis se puede determinar que los estadios preparasitarios de *Chordodes nobilii* han demostrado ser sensibles a los 6 tóxicos evaluados en las condiciones planteadas para la realización de los bioensayos, siendo el protocolo diseñado para tal fin factible de realización, repetible y confiable, y por lo tanto, válido para evaluaciones ecotoxicológicas.

Los gordiidos interactúan con distintas comunidades y con el ambiente abiótico, por lo cual los resultados obtenidos en esta Tesis podrían utilizarse para realizar inferencias acerca de lo que ocurre en un sistema acuático natural.

En el marco de éste estudio se generaron nuevos interrogantes, entre otros, ¿Cómo es posible que una breve exposición durante el desarrollo embrionario temprano de tóxicos de diferente modo de acción confluyan en la misma respuesta que determina que las larvas eclosionadas disminuyan su capacidad infectiva? ¿Cómo actúan los poluentes en el metabolismo de los parásitos? ¿Son capaces de bioacumular contaminantes? ¿Es factible realizar estudios de bioacumulación con los adultos? Reparando en que una de las condiciones para ser considerada una especie bioindicadora es que la misma posea una amplia tolerancia a variables ambientales, otro de los puntos que deben evaluarse es la tolerancia a otros factores ambientales. Por lo tanto, esta Tesis plantea nuevas líneas de investigación sobre este grupo.

Los resultados presentados, sumados al valor ecológico de *Chordodes nobilii*, fortalecen la postura de considerar a esta especie útil en la realización de evaluaciones de riesgo.

Se considera que esta Tesis es un aporte valioso para la ecotoxicología, principalmente porque a nivel regional plantea el uso de otros taxa nativos y no estandarizados en la realización de estudios ambientales. Estudios con otros enfoques, como el aquí presentado, pueden ser de utilidad en la realización de evaluaciones ecotoxicologías que cubran mayores espectros dentro del ambiente.

Estos estudios se añadirán a los ya existentes, pero se debe continuar con la búsqueda de nuevas técnicas de evaluación, las que pueden implicar el uso de grupos no utilizados habitualmente, permitirá perfeccionar los modelos predictivos para colaborar con la generación de leyes que protejan el medio y sus habitantes, incluido el hombre.

Es imperativo que de las distintas áreas de la sociedad se trabaje en la búsqueda de soluciones a la problemática ambiental. La ecotoxicología como disciplina científica se debe abocar a la búsqueda de la resolución de la problemática ambiental regional y en este sentido los estudios sobre especies nativas son de fundamental importancia para las evaluaciones de riesgo ecológico de nuestros ambientes.

Esta Tesis pretende generar un aporte a la ciencia, valorizando el hecho de observar nuestro ambiente, buscar nuevas herramientas para trabajar en pos de un ambiente saludable, y, generar nuevas líneas de investigación, sin olvidar que la integración de la información obtenida es fundamental.

Apéndices

APÉNDICE I
PARASITISMO

Considerando que esta Tesis evalúa desde un punto de vista ecotoxicológico a una especie parásita, se aclararán términos que son utilizados en la misma (Bush y col., 2001).

El parasitismo puede ubicarse dentro de las relaciones simbióticas. anisoespecífica (entre distintas especies) en la que el parásito es dependiente metabólicamente de su hospedador y no es beneficiosa para éste.

Tipos de parásitos

Dentro de los organismos denominados parásitos se pueden encontrar diversas clasificaciones. Se desarrolla la que considera la ubicación del parásito en el cuerpo del hospedador. En base a ésta se los puede clasificar como *ectoparásitos* y *endoparásitos*. Cuando el parásito está típicamente confinado al exterior del cuerpo del hospedador se habla de *ectoparásito*, ejemplos son la mayoría de los artrópodos parásitos y muchos monogeneos. Se denomina *endoparásitos* a aquellos confinados dentro del cuerpo del hospedador. Dentro de este grupo se encuentran los parásitos más familiares, tales como protozoos, digeneos, cestodes, nematodes, y acantocéfalos. Los Gordiida se clasifican dentro de este grupo.

Los juveniles de Gordiida son parásitos obligados mientras que los adultos son de vida libre.

Tipos de hospedadores

Los organismos en o sobre los que los parásitos llegan a la madurez sexual se definen como el hospedador definitivo.

Algunos parásitos requieren solamente un hospedador para completar su ciclo de vida. Dentro del parasitismo, estos ciclos se denominan *ciclos de vida directos*, todos los monogeneos, y algunos nematodes y artrópodos, tiene un ciclo de vida directo. En tanto que muchos parásitos requieren un *hospedador intermediario* obligado en el que el parásito sufre algún desarrollo y cambio morfológico, pero donde no alcanza la madurez sexual. Los ciclos de vida en los que se requieren más de un hospedador se denominan *ciclos de vida indirectos*.

Ciertos parásitos, como los Gordiida, pueden emplear hospedadores en los que si bien no se desarrollan les permite una supervivencia prolongada. Estos hospedadores se denominan *hospedadores de transporte* o *paraténicos*. Tales hospedadores son usados frecuentemente como un puente ecológico o hueco trófico. También son importantes porque ellos pueden ayudar a diseminar los estadios infectivos de los parásitos, o pueden ayudar a estos estados a atravesar condiciones desfavorables, tales como la ausencia temporaria de hospedadores definitivos.

APÉNDICE II

RESULTADOS ESTADÍSTICOS Y TABLAS POST HOC

Capítulo I Análisis de la capacidad infectiva de las larvas de *C. nobilii*.

Tabla 1: Prueba de Mann-Whitney. La variable de agrupación es: Condiciones bajo las que se llevó a cabo el desarrollo embrionario

W de Wilcoxon	1711.000
P (dos colas)	0.1058

Tabla 2: Prueba T para muestras independientes. La variable de agrupación es: El medio de ensayo

Prueba T	-0.68
p (Varianza heterogénea)	0.50
Prueba	Bilateral

Tabla 3: Prueba de Kruskal-Wallis. La variable de agrupación es: La hembra que realizó la puesta

H	74.64
p	<0,0001

Capítulo II Plaguicidas

Tabla 4. Variable ENV para embriones expuestos a Glifosato como ingrediente activo. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Gli/L	Media	DS	ES	Mediana	N
0	3,33	4,93	2,85	1,00	3
0.08	18,33	22,37	12,91	8,00	3
0.42	25,33	17,16	9,90	28,00	3
0.84	0,33	0,57	0,33	0,00	3
1.68	8,00	4,36	2,52	10,00	3
3.36	23,33	12,90	7,45	27,00	3
6.73	5,33	5,51	3,18	5,00	3
Total	12,00	14,01	3,06	8,00	21

Tabla 5. Variable ENV para embriones expuestos a Glifosato, como formulado. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Gli/L	Media	DS	ES	Mediana	N
0	3,00	2,65	1,53	2,00	3
0.07	6,67	8,08	4,67	2,00	3
0.37	14,33	13,05	7,53	10,00	3
0.74	4,00	4,58	2,65	3,00	3
1.48	10,33	8,50	4,91	7,00	3
2.96	24,33	19,14	11,05	27,00	3
5.93	20,33	12,50	7,22	20,00	3
Total	11,86	12,10	2,64	7,00	21

Tabla 6. Variable ENV para embriones expuestos a Carbendazim. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Car/L	Media	DS	ES	Mediana	N
0	9,00	7,94	4,583	6,00	3
0.01	26,67	7,37	4,256	24,00	3
0.02	31,00	9,00	5,196	31,00	3
0.04	40,00	42,46	24,515	17,00	3
0.09	50,67	29,26	16,895	43,00	3
0.18	18,00	18,52	10,693	11,00	3
0.36	47,67	24,79	14,310	52,00	3
Total	31,86	24,36	5,315	24,00	21

Tabla 7. Variable ENV para embriones expuestos a Malation. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Mal/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	4,67	7,23	4,18	1,00	3
0.04	8,00	4,36	2,52	6,00	3
0.05	7,00	4,58	2,65	6,00	3
0.07	8,67	8,50	4,91	9,00	3
0.11	16,33	3,79	2,17	18,00	3
0.22	31,00	7,00	4,04	34,00	3
Total	12,61	10,59	2,50	12,00	18

Tabla 8. Variable ENV para embriones expuestos a Malation. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Diferencias significativas según comparaciones de Tukey entre las concentraciones. * Diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), NS: no significativa.

mg Mal/L	0.04	0.05	0.07	0.11	0.22
0	NS	NS	NS	NS	*
0.04		NS	NS	NS	*
0.05			NS	NS	*
0.07				NS	*
0.11					NS

Tabla 9. Variable IIMA-E para embriones expuestos al Glifosato como ingrediente activo. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Gli/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	8,40	1,92	1,11	8,71	3
0.08	0,91	0,36	0,21	0,84	3
0.42	0,70	0,53	0,31	0,52	3
0.84	0,72	0,12	0,07	0,74	3
1.68	0,28	0,23	0,13	0,18	3
3.36	0,20	0,09	0,05	0,24	3
6.73	0,08	0,04	0,02	0,09	3
Total	1,62	2,93	0,64	0,54	21

Tabla 10. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Glifosato como ingrediente activo, concentraciones expresadas como equivalente ácido. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones para la variable IIMA-E, analizada como Log de IIMA-E, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Gli/L	0.08	0.42	0.84	1.68	3.36	6.73
0	*	*	*	*	*	*
0.08	0	NS	NS	NS	*	*
0.42		0	NS	NS	NS	*
0.84			0	NS	NS	*
1.68				0	NS	NS
3.36					0	NS

Tabla 11. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Glifosato como formulado, concentraciones expresadas como equivalente ácido. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Gli/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	4,22	1,92	1,11	3,16	3
0.07	1,48	1,08	0,62	1,80	3
0.37	0,69	0,02	0,01	0,69	3
0.74	0,22	0,15	0,09	0,14	3
1.48	0,41	0,10	0,06	0,44	3
2.96	0,35	0,10	0,06	0,38	3
5.93	0,20	0,07	0,04	0,22	3
Total	1,08	1,55	0,34	0,43	21

Tabla 12. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Glifosato como formulado. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Gli/L	0.07	0.37	0.74	1.48	2.96	5.93
0	*	*	*	*	*	*
0.07	0	NS	NS	NS	NS	NS
0.37		0	NS	NS	NS	NS
0.74			0	NS	NS	NS
1.48				0	NS	NS
2.96					0	NS

Tabla 13. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Carbendazim. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES) y Mediana para la variable IIMA-E.

mg Car/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	4,47	0,17	0,10	4,47	3
0.01	1,09	0,35	0,20	1,00	3
0.02	0,73	0,22	0,13	0,86	3
0.04	0,44	0,04	0,02	0,43	3
0.09	0,26	0,16	0,09	0,27	3
0.18	0,17	0,17	0,10	0,11	3
0.36	0,06	0,07	0,04	0,05	3
Total	1,03	1,48	0,32	0,43	21

Tabla 14. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Carbendazim. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA).Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), NS: no significativa.

mg Car/L	0.01	0.02	0.04	0.09	0.179	0.36
0	*	*	*	*	*	*
0.01		NS	*	*	*	*
0.02			NS	NS	*	*
0.04				NS	NS	NS
0.09					NS	NS
0.18						NS

Tabla 15. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Malation. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES) y Mediana.

mg Mal/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	4,87	0,81	0,46	4,97	3
0.04	1,96	0,35	0,20	2,09	3
0.05	0,82	0,13	0,078	0,90	3
0.07	0,36	0,02	0,01	0,367	3
0.11	0,07	0,00	0,00	0,07	3
0.22	0,00	0,00	0,00	0,0	3
Total	1,35	1,78	0,42	0,52	18

Tabla 16. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Malation. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA).Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones para la variable IIMA-E, analizada como Log IIMA, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Mal/L	0.04	0.05	0.07	0.11	0.22
0	*	*	*	*	*
0.04		*	*	*	*
0.05			*	*	*
0.07				*	*
0.11					*

Tabla 17. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Glifosato como ingrediente activo, concentraciones expresadas como equivalente ácido. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS) y Error Estandar (ES).

mg Gli/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	2,43	0,07	0,04	2,43	3
0.08	1,57	0,29	0,17	1,62	3
0.42	1,36	0,48	0,28	1,54	3
0.84	0,59	0,07	0,04	0,59	3
1.68	0,63	0,07	0,04	0,60	3
3.36	0,32	0,16	0,09	0,39	3
6.73	0,24	0,07	0,04	0,26	3
Total	1,02	0,78	0,17	0,67	21

Tabla 18. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Glifosato como Ingrediente Activo. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones para la variable IIMA-L, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Gli/L	0,08	0,42	0,84	1,68	3,36	6,73
0	*	*	*	*	*	*
0,08		NS	*	*	*	*
0,42			*	*	*	*
0.84				NS	NS	NS
1,68					NS	NS
3,36						NS

Tabla 19. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Glifosato como formulado, concentraciones expresadas como equivalente ácido. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS) y Error Estandar (ES).

mg Gli/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	2,38	0,53	0,30	2,67	3
0.07	1,14	0,40	0,23	0,93	3
0.37	0,85	0,07	0,04	0,88	3
0.74	0,64	0,20	0,12	0,61	3
1.48	0,52	0,27	0,15	0,39	3
2.96	0,37	0,24	0,14	0,42	3
5.93	0,08	0,01	0,01	0,08	3
Total	0,85	0,75	0,16	0,77	21

Tabla 20. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Glifosato como Formulado. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Diferencias significativas, comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), NS: no significativa.

mg Gli/L	0.07	0.37	0.74	1.48	2.96	5.93
0	*	*	*	*	*	*
0.07		NS	NS	NS	NS	*
0.37			NS	NS	NS	NS
0.74				NS	NS	NS
1.48					NS	NS
2.96						NS
5.93						

Tabla 21. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Carbendazim. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS) y Error Estandar (ES).

mg Car/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	7,55	0,69	0,40	7,37	3
0.01	4,21	0,65	0,38	3,90	3
0.02	2,00	0,20	0,12	2,00	3
0.04	1,49	0,41	0,24	1,48	3
0.07	0,83	0,52	0,30	0,75	3
0.15	0,36	0,14	0,08	0,37	3
0.30	0,34	0,11	0,07	0,40	3
Total	2,40	2,53	0,55	1,49	21

Tabla 22. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Carbendazim. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Car/L	0.01	0.02	0.04	0.07	0.15	0.30
0	*	*	*	*	*	*
0.01		*	*	*	*	*
0.02			NS	NS	*	*
0.04				NS	NS	NS
0.07					NS	NS
0.15						NS

Tabla 23. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Malatión. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS) y Error Estandar (ES).

mg Mal/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	6,1156	0,69494	0,40122	6,1000	3
0.04	0,3465	0,08761	0,05058	0,3684	3
0.05	0,2254	0,07313	0,04222	0,2222	3
0.07	0,0570	0,01073	0,00619	0,0588	3
0.11	0,0000	0,00000	0,00000	0,0000	3
0.22	0,0000	0,00000	0,00000	0,0000	3
Total	1,1241	2,31329	0,54525	0,1103	18

Tabla 24. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Malation. El medio de dilución utilizado fue agua reconstituida (EPA). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones para la variable IIMA-L, analizada como Log IIMA, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Mal/L	0.04	0.05	0.07	0.11	0.22
0	*	*	*	*	*
0.04		NS	*	*	*
0.05			*	*	*
0.07				*	*
0.11					NS

Capítulo III Efecto del agua del río sauce grande sobre la toxicidad de los plaguicidas en *Chordodes nobilii*

Tabla 25. Comparaciones, para la variable IIMA-E e IIMA-L, entre los controles de los bioensayos realizados. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N). Los valores de IIMA-E e IIMA-L se expresan como porcentaje referido al valor de media aritmética para cada control. Los p-valores se obtienen mediante ANOVA de un factor con un α ≤ 0.05.

Controles	Media	DS	ES	Mediana	N	p-valor
0EPA IIMA-E	115.02	28.45	9.48	105.96	9	0.117
0SG - IIMA-E	98.84	14.57	5.15	97.53	8	
0EPA IIMA-L	121.89	9.52	3.89	122.18	6	0.097
0SG - IIMA-L	106.67	18.84	6.28	106.67	9	

Tabla 26. Variable ENV para embriones expuestos a Glifosato, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Gli/L	Media	DS	ES	Mediana	N
0	9,00	3,606	2,082	10,00	3
0,07	4,33	3,215	1,856	3,00	3
0,33	9,00	10,440	6,028	4,00	3
0,67	9,33	8,505	4,910	9,00	3
1,34	11,33	9,292	5,364	7,00	3
2,67	13,33	9,074	5,239	12,00	3
5,34	10,00	5,568	3,215	9,00	3
Total	8,50	6,934	1,415	6,00	24

Tabla 27. Variable ENV para embriones expuestos a Carbendazim, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Car/L	Media	DS	ES	Mediana	N
0	1,00	1,00	0,58	1,00	3
0.01	9,33	5,77	3,33	6,00	3
0.022	27,67	14,98	8,65	32,00	3
0.04	81,00	32,91	19,00	100,00	3
0.09	100,00	0,00	0,00	100,00	3
0.18	100,00	0,00	0,00	100,00	3
0.36	100,00	0,00	0,00	100,00	3
Total	59,86	44,55	9,72	100,00	21

Tabla 28. Variable ENV para embriones expuestos a Carbendazim, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande (SG). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), NS: no significativa.

mg Car/L	0.01	0.02	0.04	0.09	0.18	0.36
0	NS	NS	*	*	*	*
0.01		NS	*	*	*	*
0.02			*	*	*	*
0.04				NS	NS	NS
0.09					NS	NS
0.18						NS

Tabla 29. Variable ENV para embriones expuestos a malation, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Mal/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	8,50	2,59	1,06	9,00	6
0.04	12,00	5,57	3,21	11,00	3
0.05	10,00	5,00	2,89	10,00	3
0.07	15,33	16,20	9,35	7,00	3
0.11	13,33	9,61	5,55	15,00	3
0.22	26,67	4,04	2,33	26,00	3
Total	13,48	8,98	1,96	10,00	21

Tabla 30. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Glifosato, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Gli/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	3,90	0,28	0,16	3,76	3
0.07	3,76	1,14	0,66	4,24	3
0.33	2,57	0,48	0,28	2,40	3
0.67	1,42	1,21	0,70	1,00	3
1.34	1,10	0,70	0,40	1,17	3
2.67	0,69	0,29	0,17	0,64	3
5.34	0,32	0,20	0,12	0,26	3
Total	1,97	1,51	0,33	1,76	21

Tabla 31. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Glifosato, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande (SG). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones. * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Gli/L	0.07	0.37	0.74	1.48	2.96	5.34
0	NS	NS	*	*	*	*
0.07		NS	*	*	*	*
0.33			NS	NS	NS	*
0.67				NS	NS	NS
1.34					NS	NS
2.67						NS

Tabla 32. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Carbendazim, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Car/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	2,91	0,75	0,43	3,19	3
0.01	1,42	0,15	0,08	1,43	3
0.02	0,85	0,23	0,13	0,84	3
Total	2,08	1,34	0,37	1,55	13

Tabla 33. Variable IIMA-E de embriones expuestos a Carbendazim, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande (SG). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Car/L	0.01	0.02
0	*	*
0.01		NS

Tabla 34. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Malation, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Mal/L	**Media**	**Desv. típ.**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	13,33	5,82	2,38	12,71	6
0.04	3,96	0,71	0,41	4,34	3
0.05	3,24	0,54	0,31	3,25	3
0.07	2,88	0,95	0,55	2,81	3
0.11	3,18	0,22	0,13	3,06	3
0.22	1,42	0,98	0,57	0,90	3
Total	5,91	5,69	1,24	3,43	21

Tabla 35. Variable IIMA-E para embriones expuestos a Malation, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande (SG). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones. * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Mal/L	0.04	0.05	0.07	0.11	0.22
0	NS	*	*	*	*
0.04		NS	NS	NS	NS
0.05			NS	NS	NS
0.07				NS	NS
0.11					NS

Tabla 36. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Glifosato cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Gli/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	14,14	2,11	1,22	15,18	3
0.08	9,82	1,48	0,86	9,35	3
0.39	6,64	2,62	1,51	6,13	3
0.78	6,04	0,53	0,30	6,05	3
1.56	4,81	0,28	0,16	4,76	3
3.12	2,42	0,38	0,22	2,52	3
6.24	1,76	0,47	0,27	1,77	3
Total	6,52	4,26	0,93	5,50	21

Tabla 37. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Glifosato cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande (SG). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones. * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Gli/L	0,08	0,39	0,78	1,56	3,12	6,24
0	*	*	*	*	*	*
0,08		NS	NS	*	*	*
0.39			NS	NS	*	*
0.78				NS	NS	*
1.56					NS	NS
3.12						NS

Tabla 38. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Carbendazim cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande. Se muestran Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Car/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	11,78	3,10	1,799	11,351	3
0.01	6,16	2,95	1,70	4,87	3
0.02	8,18	1,29	0,74	8,41	3
0.04	4,57	0,49	0,28	4,52	3
0.07	3,06	0,23	0,14	3,00	3
0.15	2,21	0,71	0,41	2,00	3
0.30	0,99	0,16	0,09	0,92	3
Total	6,42	4,73	0,97	4,69	24

Tabla 39. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Carbendazim, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande (SG). Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones. * Diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), NS: no significativa.

mg Car/L	0.01	0.02	0.04	0.07	0.15	0.30
0	*	*	*	*	*	*
0.01		NS	NS	NS	NS	*
0.02			NS	*	*	*
0.04				NS	NS	NS
0.07					NS	NS
0.15						NS

Tabla 40. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Malation, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande. Se muestran valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Mal/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	6,84	0,57	0,33	6,56	3
0.08	3,71	1,24	0,72	4,23	3
0.12	2,70	1,02	0,59	2,18	3
0.16	1,79	1,27	0,74	2,43	3
0.23	1,52	0,28	0,16	1,57	3
0.31	0,70	0,11	0,07	0,64	3
0.47	0,35	0,12	0,07	0,39	3
Total	3,07	2,56	0,52	2,24	24

Tabla 41. Variable IIMA-L para larvas expuestas a Malation, cuando el medio de dilución utilizado fue agua del río Sauce Grande (SG). Se muestran las diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones de Malation. * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Mal/L	**0.08**	**0.12**	**0.16**	**0.23**	**0.47**
0	*	*	*	*	*
0.08		NS	NS	NS	*
0.12			NS	NS	NS
0.16				NS	NS
0.23					NS

Tabla 42. Los p-valor obtenidos por la prueba t para la variable ENVr realizada para las concentraciones comparables de Carbendazim entre el medio EPA y el medio SG (p ≤ 0.05). * p-valor obtenidos por la prueba de Mann-Whitney. Se muestra media aritmética de ENV expresado como índice para cada tratamiento comparable. Las concentraciones corresponden a los valores nominales.

mg Car/L	**EPA**	**SG**	**p-valor**
0	1	1,00	>0.99
0.01	3	9,33	0.10*
0.02	3	27,67	0.11*
0.04	4,44	81	0.10*
0.08	5,63	100	<0.0001
0.16	2	100	<0.0001
0.32	5,30	100	<0.0001

Tabla 43. Los p-valor calculados por la prueba t para la variable ENVr realizada para las concentraciones comparables de Malation entre el medio EPA y el medio SG. (p ≤ 0.05). * p-valor obtenidos por la prueba de Mann-Whitney. Se muestra media aritmética de ENV para cada tratamiento comparable. Las concentraciones corresponden a los valores nominales.

mg Mal/L	**EPA**	**SG**	**p-valor**
0	1	2,67	0.2*
0.05	1,71	4,00	0.13
0.07	1,50	3,33	0.17
0.10	1,86	5,11	0.38
0.15	3,50	4,44	0.65
0.30	6,64	8,89	0.12

Tabla 44. Los p-valor calculados por la prueba t para la variable IIMA-Er, realizada para las concentraciones comparables de Glifosato entre el medio EPA y el medio SG. ($p \leq 0.05$). Se muestra media aritmética de IIMA-E para cada tratamiento comparable. Las concentraciones corresponden a los valores nominales.

mg Gli/L	EPA	SG	p-valor
0	4,22	3,90	0.99
0.07	1,48	3,76	0.14
0.40	0,69	2,57	0.02
0.75	0,22	1,42	0.25
1.50	0,41	1,10	0.23
3.00	0,35	0,69	0.24
6.00	0,20	0,31	0.64

Tabla 45. Los p-valor calculados por la prueba t para la variable IIMA-Er realizada para las concentraciones comparables de Carbendazim entre el medio EPA y el medio SG. ($p \leq 0.05$). Se muestra media aritmética de IIMA-E para cada tratamiento comparable. Las concentraciones corresponden a los valores nominales.

mg Car/L	EPA	SG	p-valor
0	4,47	2,91	0.99
0.01	1,09	1,42	0.01
0.02	0,73	0,85	0.07

Tabla 46. Los p-valor calculados por la prueba t para la variable IIMA-Er realizada para las concentraciones comparables de Malation entre el medio EPA y el medio SG. ($p \leq 0.05$). *p-valor obtenidos por la prueba de Mann-Whitney. Se muestra media aritmética de IIMA-E para cada tratamiento comparable. Las concentraciones corresponden a los valores nominales.

mg Mal/L	EPA	SG	p-valor
0	4,87	13,33	0.10
0.05	1,96	3,96	0.98
0.07	0,82	3,24	0.01
0.10	0,36	2,88	0.06
0.15	0,07	3,18	0.02
0.30	0,00	1,42	0.03

Tabla 47. Los p-valor calculados por la prueba t para la variable IIMA-Lr realizada para las concentraciones comparables de Glifosato entre el medio EPA y el medio SG. ($p \leq 0.05$). Se muestra media aritmética de IIMA-L para cada tratamiento comparable. Las concentraciones corresponden a los valores nominales.

mg Gli/L	EPA	SG	p-valor
0	2,38	14,14	0.99
0.07	1,14	9,82	0.13
0.40	0,85	6,64	0.36
0.75	0,64	6,04	0.04
1.50	0,52	4,82	0.02
3.00	0,37	2,42	0.80
6.00	0,08	1,76	0.01

Tabla 48. Los p-valor calculados por la prueba t para la variable IIMA-Lr realizada para las concentraciones comparables de Carbendazim entre el medio EPA y el medio SG ($p \leq 0.05$). Se muestra media aritmética de IIMA-L para cada tratamiento comparable. Las concentraciones corresponden a los valores nominales.

mg Car/L	EPA	SG	p-valor
0	7,55	11,78	0.10
0.01	4,20	6,16	0.83
0.02	2,00	8,18	0.00
0.04	1,49	4,57	0.01
0.08	0,83	3,06	0.02
0.16	0,36	2,21	0.02
0.32	0,34	0,99	0.03

Tabla 49. Los p-valor calculados por la prueba t para la variable IIMA-Lr realizada para las concentraciones comparables de malation entre el medio EPA y el medio SG. ($p \leq 0.05$). Se muestra media aritmética de IIMA-L para cada tratamiento comparable. Las concentraciones corresponden a los valores nominales.

mg Mal/L	EPA	SG	p-valor
0	6,11	6,84	0.08
0.07	0,06	3,71	0.04
0.10	0,00	2,70	0.04
0.22	0,00	1,52	0.01

Capítulo IV Tóxicos Referentes

Tabla 50. Variable ENV para embriones expuestos al DSS. Se muestran valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg DSS/L	Media	DS	ES	Mediana	N
0	15,00	13,23	7,64	10,00	3
0,10	10,33	11,93	6,89	5,00	3
0,50	26,00	18,25	10,53	17,00	3
1,00	8,00	4,36	2,52	10,00	3
2,00	6,33	7,77	4,48	4,00	3
4,00	28,67	7,09	4,10	30,00	3
8,00	34,33	0,58	0,33	34,00	3
Total	18,38	13,79	3,01	15,00	21

Tabla 51. Variable ENV para embriones expuestos al Cd+2. Se muestran valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Cd/L	Media	DS	ES	Mediana	N
0	2,67	1,15	0,67	2,00	3
0,40	3,67	0,58	0,33	4,00	3
0,92	5,00	1,00	0,58	5,00	3
1,90	6,00	2,64	1,53	5,00	3
3,60	3,67	4,04	2,33	3,00	3
7,10	9,33	5,77	3,33	6,00	3
Total	5,05	3,47	0,82	4,00	18

Tabla 52. Variable ENV para embriones expuestos al Cr+6. Se muestran valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N) para la variable ENV.

mg Cr/L	Media	DS	ES	Mediana	N
0	1,00	1,00	0,58	1,00	3
0.40	25,00	16,52	9,54	17,00	3
0.90	65,67	29,84	17,23	51,00	3
1.80	100,00	0,00	0,00	100,00	3
3.80	100,00	0,00	0,00	100,00	3
7.80	100,00	0,00	0,00	100,00	3
Total	65,28	42,32	9,97	100,00	18

Tabla 53. Variable ENV para embriones expuestos al Cr+6. Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones,* Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Cr/L	**0.40**	**0.9**	**1.8**	**3.8**	**7.8**
0	NS	*	*	*	*
0.40	0	*	*	*	*
0.9		0	NS	NS	NS
1.8			0	NS	NS
3.8				0	NS

Tabla 54. Variable IIMA-E para embriones expuestos al DSS. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg DSS/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	5,27	0,30	0,17	5,27	3
0.10	1,10	0,52	0,30	1,00	3
0.50	0,53	0,18	0,10	0,63	3
1.00	0,52	0,21	0,12	0,63	3
2.00	0,53	0,10	0,06	0,53	3
4.00	0,35	0,03	0,02	0,36	3
8.00	0,09	0,05	0,03	0,10	3
Total	1,20	1,74	0,38	0,63	21

Tabla 55. Variable IIMA-E para embriones expuestos al DSS. Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg DSS/L	**0.1**	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**
0	*	*	*	*	*	*
0.1		NS	NS	NS	*	*
0.5			NS	NS	NS	NS
1				NS	NS	NS
2				NS	NS	NS
4						NS

Tabla 56. Variable IIMA-E para embriones expuestos al Cd+2. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Cd/L	**Media**	**DS**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	3,73	0,70	0,40	3,63	3
0.40	2,37	0,23	0,13	2,27	3
0.92	1,32	0,27	0,16	1,45	3
1.90	0,85	0,12	0,07	0,90	3
3.60	0,54	0,01	0,01	0,54	3
7.10	0,06	0,11	0,06	0,00	3
Total	1,48	1,30	0,31	0,96	18

Tabla 57. Variable IIMA-E para embriones expuestos al Cd+2. Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Cd/L	**0.4**	**0.92**	**1.9**	**3.6**	**7.1**
0	*	*	*	*	*
0.4		*	*	*	*
0.92			ns	ns	*
1.9				ns	ns
3.6					ns

Tabla 58. Variable IIMA-E para embriones expuestos al Cr+6. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Cr/L	**Media**	**DS.**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	2,72	1,02	0,59	3,16	3
0,40	0,81	0,14	0,08	0,76	3
0,90	0,20	0,10	0,07	0,20	2
Total	1,38	1,27	0,45	0,86	8

Tabla 59. Variable IIMA-E para embriones expuestos al Cr+6. Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Cr/L	**0,4**	**0.9**
0	*	*
0,4	….	ns

Tabla 60. Variable IIMA-L para larvas expuestas al DSS. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg DSS/L	**Media**	**DS.**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	3,05	1,49	0,86	2,81	3
0,10	0,54	0,26	0,15	0,44	3
0,50	0,52	0,04	0,02	0,53	3
1,00	0,24	0,11	0,07	0,24	3
2,00	0,20	0,09	0,05	0,18	3
4,00	0,03	0,03	0,02	0,05	3
8,00	0,12	0,01	0,01	0,10	3
Total	0,67	1,12	0,24	0,30	21

Tabla 61. Variable IIMA-L para larvas expuestas al DSS. Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg DSS/L	**0,1**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**
0	*	*	*	*	*	*
0,1		NS	NS	NS	NS	NS
0,5			NS	NS	NS	NS
1				NS	NS	NS
2				NS	NS	NS
4						NS

Tabla 62. Variable IIMA-L para larvas expuestas al Cd+2. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Cd/L	**Media**	**DS.**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	2,05	0,30	0,17	2,19	3
0,40	0,5	0,27	0,16	0,53	3
0,92	0,86	0,71	0,41	0,52	3
1,90	0,32	0,16	0,09	0,33	3
3,60	0,21	0,07	0,04	0,18	3
7,10	0,12	0,09	0,05	0,09	3
Total	0,69	0,73	0,17	0,36	18

Tabla 63. Variable IIMA-L para larvas expuestas al Cd+2. Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Cd/L	**0,40**	**0,92**	**1.9**	**3.6**	**7.10**
0	*	*	*	*	*
0.40		NS	NS	NS	NS
0.92			NS	NS	NS
1.90				NS	NS
3.60				NS	NS

Tabla 64. Variable IIMA-L para larvas expuestas al Cr+6. Se muestran los valores de Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N).

mg Cr/L	**Media**	**DS.**	**ES**	**Mediana**	**N**
0	11,87	4,15	2,40	10,20	3
0,16	3,65	0,41	0,24	3,83	3
0,33	1,69	0,22	0,12	1,70	3
0,50	1,63	0,80	0,46	1,40	3
3,20	0,68	0,25	0,15	0,77	3
6,70	0,48	0,17	0,10	0,44	3
Total	3,33	4,32	1,02	1,58	18

Tabla 65. Variable IIMA-L para larvas expuestas al Cr+6. Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las concentraciones, * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

mg Cr/L	0,16	0,33	0,5	3,2	6,7
0	*	*	*	*	*
0,16		NS	NS	NS	NS
0,33			NS	NS	NS
0,5				NS	NS
3,2					NS

Capítulo V Temperatura

Tabla 66. Media, Desvío Estándar (DS), Error Estandar (ES), Mediana y el número de tratamientos (N) para la variable IIMA-L del ensayo realizado con larvas expuestas a dos temperaturas extremas, -3 y a 40.5 ±1ºC, el control se mantuvo a 22±1ºC.

Temperatura (ºC)	Media	DS	ES	Mediana	N
-3±1	2,53	0,89	0,52	2,12	3
22±1	3,97	0,38	0,15	4,01	6
40.5±1	0,09	0,08	0,045	0,10	3
Total	2,64	1,72	0,50	3,52	12

Tabla 67. Diferencias significativas, según comparaciones de Tukey, entre las temperaturas para la variable IIMA-L del ensayo realizado con larvas expuestas a dos temperaturas extremas, -3 y a 40.5 ±1ºC, el control se mantuvo a 22±1ºC. * Diferencia estadísticamente significativa (p ≤ 0.05), NS: no significativa.

Temperatura (ºC)	*40.5±1*	-3±1
22±1	*	*
40.5±1	0	*

Análisis de Regresión

Tabla 68. Resultados obtenidos del análisis de regresión para cada punto final considerado según el bioensayos realizado. R2: Coeficiente de determinación.
Diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), en cursiva se destacan los valores que no muestran diferencias significativas.

Plaguicida	**Punto final**	**R^2**	**R^2 corregido**	**Recta de regresión**	**p valor de b**
Glifosato I.A.	ENV	0.01	0.00	-0.35x + 12.89	*0.7336*
	IIMA-E	0.47	0.44	-0.09x + 0.74	0.0016
	IIMA-L	0.51	0.48	-0.13x + 1.16	0.0008
Glifosato F.	ENV	0.27	0.23	3.42x + 6.79	0.0165
	IIMA-E	0.20	0.15	-0.14x + 0.80	*0.0645*
	IIMA-L	0.62	0.60	-0.17x + 0.89	0.0001
Glifosato F. SG	ENV_SG	2.9^{-03}	0.00	0.20x + 10.22	*0.8162*
	IIMA-E_SG	0.47	0.44	-0.51x + 2.52	0.0016
	Log_IIMA-L_SG	0.824	0.813	-0.116x + 0.880	0.000
Malation	ENV	0.80	0.79	0.14x + 0.47	<0.0001
Malation	IIMA-E	0.48	0.44	-0.01x + 1.42	0.0042
Malation	IIMA-L	0.46	0.42	$-1.4^{-03}x + 0.28$	0.0053
Malation	ArcoS_IIMA-L	0.55	0.51	$-6.8^{-04}x + 0.17$	0.0016
Malation SG	ENV	0.41	0.38	0.08x + 7.90	0.0018
	IIMA-E	0.58	0.55	-0.01x + 4.13	0.0009
	IIMA-L	0.61	0.59	-0.01x + 3.6	0.0001
Carbendazim	ENV	0.07	0.02	0.05x + 26.67	*0.2567*
	IIMA-E	0.50	0.46	$-2.2^{-0.3}x + 0.72$	0.0011
	IIMA-L	0.44	0.41	-0.01x + 2.43	0.0025
	ENV_SG	0.47	0.44	0.25x + 34.85	0.0007
	IIMA-E_SG	0.83	0.79	-0.03x + 1.73	0.0046
	IIMA-L_SG	0.58	0.55	-0.02x + 6.16	0.0003

APÉNDICE III
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

TRABAJOS PUBLICADOS

Achiorno, Cecilia L., de Villalobos, Cristina and Ferrari, Lucrecia. 2010. Validation test with embryonic and larval stages of *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha): Sensitivity to three reference toxicants. Chemosphere. 81, 2, 133-140

Achiorno, Cecilia L., de Villalobos, Cristina and Ferrari, Lucrecia. 2009. Sensitivity of preparasitic stages of Chordodes nobilii (Gordiida, Nematomorpha) to malatión. Ecotoxicology. 18, 5, 594 - 599. DOI 10.1007/s10646-009-0317-2

Achiorno, Cecilia L., de Villalobos, Cristina and Ferrari, Lucrecia. 2008. Toxicity of the herbicide glyphosate to *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha). Chemosphere. 71, 1816–1822.

Achiorno, Cecilia L., Ferrari, Lucrecia, de Villalobos, Cristina. 2008. Effect of extreme temperature on egg development, larval and adult survival of *Chordodes nobilii* Camerano, 1901 (Gordiida, Nematomorpha). Acta Parasitologica, 53, 4, 392–396 DOI: 10.2478/s11686-008-0052-5. 2008 W.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Achiorno C., de Villalobos C., Ferrari L.. “Comparación del efecto de tres plaguicidas sobre *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha) en dos medios de dilución: agua reconstituida y agua del medio natural”. III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. Congreso Nacional Santa Fe. Argentina. 2010.

Achiorno C., de Villalobos C., Ferrari L.. “Evaluación de un pulso contaminante de malatión sobre el desarrollo embrionario de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha) en agua natural y agua reconstituida”. IX Congreso de la Sociedad de Química y Toxicología Ambiental de Latinoamérica (SETAC LA)- II Congreso SETAC PERU. Congreso Internacional Lima, Perú. 2009.

Achiorno C.; de Villalobos C.; Ferrari L.. “Sensibilidad al Glyfosato durante el desarrollo embrionario de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha) en agua reconstituida y en agua del arroyo Sauce Grande.” "Ecotoxicología y Responsabilidad Social” V Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos. Congreso Nacional, Luján, Argentina. 2008.

Achiorno C.; de Villalobos C.; Ferrari L.. “Susceptibilidad al Cr (VI) durante la etapa embrinaria y larval de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha).” II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). (VI Reunión SETAC Argentina). Congreso Nacional, Mar del Plata, Argentina. 2008.

Achiorno C.; de Villalobos C.; Ferrari L.. “Efecto del Glyfosato sobre el desarrollo embrionario de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha) en agua de su ambiente natural.” IV Congreso Argentino de Limnología. Congreso Nacional, Bariloche, Argentina. 2008.

Achiorno C.; de Villalobos C.; Ferrari L. & Zanca F. “Incidencia de las temperaturas extremas sobre el desarrollo embrionario y la supervivencia de las larvas y los adultos de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha).” IV Congreso Argentino de Limnología. Congreso Nacional, Bariloche, Argentina. 2008.

Achiorno Cecilia; de Villalobos Cristina; Ferrari Lucrecia. “Evaluación de la sensibilidad al malation en etapas preparasitarias de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha)”. VIII Congreso de la Sociedad de Química y Toxicología Ambiental de América Latina (SETAC LA) “Ecotoxicología y Desarrollo Sustentable”. Congreso internacional, Montevideo, Uruguay. 2007.

Achiorno Cecilia; de Villalobos Cristina; Ferrari Lucrecia. “Determinación de la susceptibilidad al cadmio durante la etapa embrionaria y larval de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha)”. VIII Congreso de la Sociedad de Química y Toxicología Ambiental de América Latina (SETAC LA) “Ecotoxicología y Desarrollo Sustentable”. Congreso internacional, Montevideo, Uruguay. 2007.

Achiorno Cecilia; de Villalobos Cristina; Ferrari Lucrecia; Zanca, Fernanda. “Efectos de la Temperatura Sobre las Distintas Etapas del Ciclo de Vida de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha)”. VIII Congreso XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Congreso Nacional, Rosario, Argentina. 2006.

Achiorno Cecilia; de Villalobos Cristina; Ferrari Lucrecia. “Evaluación de la susceptibilidad a agroquímicos durante las fases iniciales de desarrollo de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha). III Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida. 4º Congreso de Ambiente y Calidad de Vida. Congreso Internacional, San Fernando del Valle de Catamarca, Catamarca, Argentina. 2006.

Achiorno C, de Villalobos C, Ferrari L. “Sensibilidad a diferentes tóxicos en primeros estadios de vida de *Chordodes nobilii*.” XIV Congreso Argentino de Toxicología. Congreso Internacional, Mendoza, Argentina. 2005.

BIBLIOGRAFÍA

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. PRODUCTOS DOMISANITARIOS, Disposición 2659/2008, Bs. As., 8/5/2008, Expediente Nº 1-47-2110-8662-07-3. Publicada en el Boletín Oficial del 14-may-2008, Número: 31404, Página: 38.
www.sertox.com.ar/modules.php?name=News&file=article&sid=930

Aduriz, M.A.; Gargano, A.O.; Chimeno, P.; Saldungaray, M.C.; Conti, V.P. (2003). Caracterización de los agrosistemas predominantes de la cuenca alta del río Sauce Grande. RIA, 32 (3): 3-26 INTA, Argentina. ISSN 0325 – 8718.

Albert Lilia A. (1997). Introducción a la toxicología ambiental. México. ECO/OPS

Aluigi M.G., C. Angelini, C. Falugi, R. Fossa, P. Genever, L. Gallus, P.G. Layer, G. Prestipino, Z. Rakonczay, M. Sgro, H. Thielecke, S. Trombino. (2005). Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. Chemico-Biological Interactions., 157–158. 305–316.

Álvarez Olga Alda, Tjalling Jager, Marco Redondo Eliana, and Kammenga Jan E. (2006). Physiological modes of action of toxic chemicals in the nematode *Acrobeloides nanus*. Environmental Toxicology and Chemistry. 25, 12: 3230–3237.

Andreeva, R. V. (1978). Parasitism of gordiids in the larvae of *Tabanus autumnalis* L. horseflies]. Parazitologiia, 12: 90-91.

Antón, F.A., Laborda, E., De Ariz, M., (1994). Acute toxicity of the herbicide glyphosate to fish. Chemosphere, 28: 745–753.

APHA, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th Ed., Washington DC.

APHA, (1999). Standard methods for examination of water and wastewater (20th Ed.). APHA-AWWA.WPCF, Washington DC.

ATSDR. (2003). Agency for Toxic Substances & Disease Registry, Public Health Service, Toxicological profile for malathion. US Department of Health and Human Services. Accessed at http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp154.html

Baer J.G. (1951). Gordiacea. Ecology of animal parasites. University Illinois Press Urbana. 43-45.

Baird, R.B., Berger, R., Gully, J. (1996). Improvement in point estimation methods and application to controlling aquatic ecotoxicology test reliability. In: Grothe, D.R., Dickson, K.L., ReedJudkins, D. (Eds.), Whole Effluent Toxicity Testing: An Evaluation of Methods and Prediction of Receiving System Impacts. SETAC Press, Pensacola, FL. 103–130.

Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., Riva, M.C. (2006). Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. Aquat. Toxicol., 78:, 1: 1-14.

Bareth, C. (1974). Kystes et larves de Gordiacés chez 3 especes de campodes cavernicoles. Bulletin de la Société zoologique de France, 100. 274.

Bareth, C. (1974). Présence de kystes et de larves do Gordiacés chez plusieurs espéces de Campodés cavernicoles (Diploures Campodéides). Annales de Spéléologie, 29: 657-662.

Baylis A.D. (2000). Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. Pest Management Science, 56: 299-308.

Battaglin William A., Dana W. Kolpin, Elizabeth A. Scribner, Kathryn M. Kuivila, and Mark W. Sandstrom. (2005). Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 2002. Journal of the American Water Resources Association American Water Resources Association.

Beiras, R., Albentosa, M. (2004). Inhibition of embryo development of the commercial bivalves Ruditapes decussatus and Mytilus galloprovincialis by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria. Aquaculture, 230: 205-213.

Bellas, J, Vazquez E. and Beiras, J. (2001). Toxicity of Hg, Cu, Cd, and Cr on early developmental stages of *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment. Water Research, 35, 12: 2905-2912

Bellas, J, Beiras, J and Vazquez E. (2003). A standarisation of *Ciona intestinalis* embryo larval bioassay for ecotoxicological studies. WaterResearch, 37: 4613-4622.

Bergey Lauren, Weis Judith S., Weis Peddrick. (2002). Mercury uptake by the estuarine species *Palaemonetes pugio* and *Fundulus heteroclitus* compared with their parasites, *Probopyrus pandalicola* and *Eustrongylides* sp. Marine Pollution Bulletin, 44: 1046–1050

Blair, D. (1983). Larval horsehair worms (Nematomorpha) from the tissues of native freshwater fish in New Zealand. New Zealand Journal of. Zoology, 10: 341-344.

Blunk, H. (1924). Die Überwinterung von *Gordius aquaticus* L. in Dytiscus marginalis L. Zoologischer Anzeiger, 61: 266-267.

Bolek M., Coggins J. (2002). Seasonal occurrence, morphology, and observation on the life history of *Gordius difficilis* (Nematomorpha: Gordioidea) from southeastern Wisconsin, United States. Journal of Parasitology, 88: 287–294. DOI: 10.1645/0022-3395.

Bollmohr, Silke and Schulz, Ralf, (2009). Seasonal changes of macroinvertebrate communities in a Western Cape river, South Africa, receiving nonpoint-source insecticide pollution. Environmental Toxicology and Chemistry, 28, 4: 809 – 817. DOI: 10.1897/08-228R.1

Bonfanti P, Colomboa A, Orsia F, Nizzettoa I, Andriolettib M, Bacchettab R, Manteccab P, Fascioc U, Vailatib G, Vismarab C. (2004). Comparative teratogenicity of Chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development. Aquat Toxicol, 70:189–200. doi:10.1016/j.aquatox.2004.09.007.

Bouche, M.L, Habets, F., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., (2000). Toxic Effects and Bioaccumulation of Cadmium in the Aquatic Oligochaete *Tubifex tubifex*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 46, 3: 246-251.

Brock Theo C.M., Arts Gertie H.P., Maltby Lorraine, and Van den Brink Paul J. (2006). Aquatic Risks of Pesticides, Ecological Protection Goals, and Common Aims in European Union Legislation. Integrated Environmental Assessment and Management, 2, 4: 20–46.

Budischak S.A., Belden L.K., Hopkins W.A. (2008). Effects of malathion on embryonic development and latent susceptibility to trematode parasites in ranid tadpoles. Environ Toxicol Chem, 27, 12: 2496 - 2500. doi:10.1897/08-018.1

Buhl, K.J., Faerber, N.L. (1989). Acute toxicity of selected herbicides and surfactants to larvae of the midge *Chironomus riparins*. Arch. Environ. Con. Tox., 18: 530–536.

Bulus Rossini G., Ronco A.E. (2004). Sensitivity of *Cichlasoma facetum* (Cichlidae, Pisces) to metals. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 72: 763-768.

Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotsg, J.M., Shotsak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al., revisited. J. Parasitol., 83, 576–583. American Society of Parasitology.

Bush, A.O., Fernández, J.C., Esch, G.W., Seed, J.R. (2001). Parasitism The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press.

Cabrera, A. L. (1971). Fitogeografía de la Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, XIV (1,2): 1-42.

Cabrera, A. L. (1976). Regiones Fitogeográficas Argentinas. Enciclopedia de Agricultura y Jardinería. Editorial ACME. Buenos Aires. Tomo II, 86 pp.

Calevro Federica, Cristina Filippi, Paolo Deft, Cristina Albertosi, Renata Batistoni. (1998). Toxic effects of aluminium, chromium and cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. Chemosphere, 37, 4: 651-659,

Camerano, L. (1894). Viaggio del Dottor Alfredo Borelli nella Repubblica Argentina e nel Paraguay. Gordii. Bollettino dei Musei di Zoologia ed anatomia comparata della R. Universita di Torino, 9: 1-6.

Camerano, L. (1897). Monografia dei Gordei. Mem. R. Acad. Sci. Torino, 47: 339-419.

Camerano, L. (1915). Revisione dei Gordii. Memorie della Reale Academia della Sciencze di Torine, serie II, 66: 1-66.

Cappuci, D. T. (1976). The biology of *Gordius robustus* Leidy with a host list and summary of the public health importance of the Gordioidea. PHD. Thesis, University of California. 241pp.

Carriquiriborde P., Ronco A.E. (2002). Acute effect of metals on the Neotropical species *Odonthestes bonariensis* (Pisces, Atherinidae). Bull. Environ. Contam. Toxicol, 69: 294-301.

Chandler C.M. (1985). Horsehair worms (Nematomorpha, Gordioidea) from Tennessee, with a review of taxonomy and distribution in the United States. Journal of the Tennessee Academy of Science, 60: 59-62.

Chitwood, B. G. and Chitwood, M. B. (1937). Snails as hosts and carriers of nematodes and Nematomorpha. Nautilus, 50: 130-135.

Chu, K.W., Chow, K.L. (2002). Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. Aquat. Toxicol., 61: 53–64.

Cochran P.A, A. Kinziger & W.J. Poly. (1999). Predation on horsehair worms (Phylum Nematomorpha). J. Fres. Ecol., 14: 211-218.

Connell Des W.. (1997). Basic Concepts of Environmental Chemistry. Editorial Lewis Publishers. Boca Raton, New York. United States of America. Páginas 506.

Cook L.W., Paradise C.J., Lom B. (2005). The pesticide malathion reduces survival and growth in developing zebrafish. Environ Toxicol Chem, 24: 1745–1750. doi:10.1897/04-331R.1

Cort, W. W. (1915). *Gordius* larvae parasitic in a trematode. Journal of Parasitology, 1, 189-199.

Cripe, G. (1994). Comparative acute toxicities of several pesticides and metals to *Mysidopsis bahia* and postlarval *Penaeus duorarum*. Environ Toxicol Chem, 13: 1867–1872. doi:10.1897/1552-8618(1994)13[1867:CATOSP]2.0.CO;2

Cserháti, T., Forgács, E., Oros G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. Environment International, 28, 5: 337-348.

Cuppen Jan G.M., Van den Brink Paul J., Camps Edith, Uil Kristiaan F., Brock Theo C.M. (2000). Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. Aquatic Toxicology, 48: 233–250. PII: S0166-445X(99)00036-3.

Daam Michiel A., Kriengkrai Satapornvanit, Paul J. Van den Brink, António J.A. Nogueira. (2009). Sensitivity of macroinvertebrates to carbendazim under semi-field conditions in Thailand: Implications for the use of temperate toxicity data in a tropical risk assessment of fungicides. Chemosphere, 74: 1187-1194.

Damásio Joana, Romà Tauler, Elisabeth Teixidó, Maria Rieradevall, Narcis Prat, Maria Carmen Riva, Amadeu M.V.M. Soares, Carlos Barata. (2008). Combined use of Daphnia magna in situ bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain). Aquatic Toxicology, 87: 310–320. doi:10.1016/j.aquatox.2008.02.016.

Dang Z. y Smit C.E. (2008). Environmental risk limits for carbendazim. Letter report 601716014/2008. National Insitute for Public Health and the Environment.

de la Torre, F. (2001). Tesis: Estudio de la contaminación acuática mediante bioensayos y parámetros fisiológicos y bioquímicos, indicador de estrés ambiental. Disertación Doctoral. Fac. Cs. Ex. Natur. UBA.

Demichelis, S.O.; Ferrari, L.; Garcia, M.E.; de la Torre, F.R. and Salibián, (2001). Tadpoles assays: its aplication to a water toxicity assessment of a polluted urban river. Environmental Monitoring and Assessment, 68: 63-73.

de Villalobos, C., (1995). Una nueva especie del genero *Chordodes* Creplin, 1874 en la Argentina. Neotrópica, 41 (105-106): 63-65. ISSN 0548-1686.

de Villalobos, L.C., Miralles, D.B. (1997). Una nueva especie de *Chordodes* (Gordiaceo, Nematomorpha) parasita de Blaptica sp. (Blaberidae, Blataria). Comun. Museo Ciencias Tecnol., PUCRS Ser Zool., 10: 45–51.

de Villalobos, L.C. (1999). Consideraciones sobre los daños ocasionados en insectos por Nematomorfos. Revista de la Sociedad de Ciencias Morfológicas, 3, (6): 11-16.

de Villalobos L.C., Ribera I. and Downie I.S. (1999). Hairworms found in Scottish agricultural land, with descriptions of two new species of *Gordionus* Muller (Nematomorpha, Gordiidae). Journal of Natural History, 33: 1767-1780.

de Villalobos, L.C. y Voglino, D. (2000). Description of *Gordionus porosus* n.sp. and redescription of *Gordionus ondulatus* (Nematomorpha, Parachordodinae) with scanning electron microscopy. Journal of Parasitology, 86 (2): 358-365.

de Villalobos, L.C.; Ramirez, G.; Chavarria, S. and Zanca, F. (2000). Cuticle Ultastructural features of *Paragordius esavianus* Carvalho 1942 and *Paragordius varius* (Leidy 1851) Nematomorpha, Chordodidae, Paragordinae). Procceding of Academy of Science of Philadelphia, 150: 135-144.

de Villalobos, C. and Restelli M. (2001). Ultrastructural study of cuticle and epidermis in *Pseudochordodes bedriagae* (Nematomorpha ,Gordidae). Cell & Tissue Research., 305 (1): 129-134.

de Villalobos L. Cristina, Zanca F. (2001). Scanning electron microscopy and intraspecific variation of *Chordodes peraccae* and *Chordodes festae* (Gordiacea, Nematomorpha). Systematic Parasitology. London. 50: 117-125. ISSN 0165-5752

de Villalobos, C.; Rumi, A., Núñez, V., Schmidt-Rhaesa, A. and Zanca, F. (2003)a.Paratenic hosts: larval survival strategy in *Paragordius varius* (Leidy, 1851) (Gordiida, Nematomorpha). Acta Parasitologica 48 (2): 98-102.

de Villalobos L.C., Schmidt- Rhaesa A. y Zanca F. (2003)b. Revision of the genus *Beatogordius* (Gordiida, Nematomorpha) II South American species with inclusion of two new species. Mem Oswaldo Cruz., 98: 115-128.

de Villalobos C y Ronderos M. (2003). *Dasyhelea necrophila* Spinelli and Rodriguez 1999 (Diptera Ceratopogonidae), a new paratenic host of *Paragordius varius* (Leidy,1851) (Gordiida, Nematomorpha). Acta Parasitologica 48 (3): 218-221.

de Villalobos C., Zanca F. and Schmidt-Rhaesa. (2004). A. New data on South American species of *Chordodes* (Nematomorpha). Revista do Museu Nacional/UFRJ. Brasil., 62: 375-386.

de Villalobos L. Cristina, Zanca F. and Schmidt-Rhaesa A. (2005). New data on South American species of *Chordodes* (Nematomorpha). Revista do Museu Nacional/ Universidade Federal do Rio de Janeiro. UFRJ. Brasil., 62: 375-386 ISSN 0365-4508.

de Villalobos C, Ortiz-Sandoval J.J & Habit E. (2008). Finding of *Gordius austrinus* (Gordiida, Nematomorpha) in the diet of *Salmo Trutta* (Salmoniformes) in Patagonia. Gayana, 72 (1): 31-35. ISSN 0717-652X.

Días-Baéz, M.C., Bustos López, M.C., Espinoza Ramirez, A.J. (2004). Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. Editorial: Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá). Publicado por Unibiblos - U. Nal. Colombia. http://books.google.com.ar/books.

Dickson T.R. (1994). Química, Enfoque Ecológico. Editorial Limusa. Noriega Editores. México, D.F. pp 406.

Donkin, S.G., Williams, P. (1995). Influence of Developmental Satage, Salts and Food Presence on Various End Points Using Caenorhabditis elegans for Aquatic Toxicity Testing. Environ. Toxicol. Chem., 14, 12 : 2139-2147.

Dorier A. (1925). Sur la faculté d'enkystment dans l'eau de la larve du *Gordius*. Compte Rendu de l'Académie des Sciences, Paris, 181: 1098-1099.

Dorier, A. (1930). Recherches biologiques et systematiques sur les Gordiaces. Trav. Lab. Hydrobiol. Piscicult. Grenoble, 22: 1-183.

Dorn, P.B., Rodgers, J.H. Jr., Jop, K.M., Raia, J.C., Dickson, K.L. (1987). Hexavalent chromium as a reference toxicant in effluent toxicity test. Environ. Toxicol. Chem., 6, 435-444.

Du Min, Dayong Wang. (2009) .The neurotoxic effects of heavy metal exposure on GABAergic nervous system in nematode *Caenorhabditis elegans*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 27 : 314–320. doi:10.1016/j.etap.2008.11.011

Elijah Oyoo-Okoth, Admiraal Wim, Odipo Osano, Michiel H.S. Kraak, Veronica Ngure, Judith Makwali and Paul S. Orina. (2010). Use of the fish endoparasite *Ligula intestinalis* (L., 1758) in an intermediate cyprinid host (*Rastreneobola argentea*) for biomonitoring heavy metal contamination in Lake Victoria, Kenya. Lakes & Reservoirs: Research and Management, 15: 63–73

Espina, S., y C. Vanegas, (2005). Ecotoxicología y contaminación, p.79-120. Int, A. V. Bottello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal. Autón. De México, Instituto Nacional de Ecología. 695 p.

Fargasová, A. (1994). Toxicity of metals on *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 27: 210-213.

Fernandez, H. R., F. Romero and E. Domínguez. (2008). Intermountain basins use in subtropical regions and their influences on benthic fauna. River Research and Applications. River. Res. Applic. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) doi: 10.1002/rra.1114

Ferrari, L., del Giorgio, P., Lombardo, R.J., Tortorelli, M.C., Hernandez, D.A. (1989). Effect of formulated parathion on fertilization of the sea urchin *Pseudechinus magellanicus* (Philippi). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42: 673 374.

Ferrari, L.; Demichelis, S.O.; Garcia, M.E.; de la Torre, F.R. and Salibián, A. (1997). Premetamorphic anuran tadpoles as test organism for an acute Aquatic toxicity assay. Environmental Toxicology and Water Quality, 12 (2):118-121.

Ferrari, L.; Garcia, M.E.; de la Torre, F.R. y Demichelis, S.O. (1998). Evaluación Ecotoxiciológica del agua de un río urbano mediante bioensayos con especies nativas. (Rev. Museo Argentino de Ciencias Naturales. Vol. Extra Nueva serie Nº 148: 1-16

Ferrari L., de la Torre F.R., Demichelis S.O., Garcíad M.E. and Salibián A. (2005). Ecotoxicological assessment for receiving waters with the premetamorphic tadpoles acute assay. Chemosphere, 59, 4: 567-575. doi:10.1016/j.chemosphere.

Ferrari L., (2006). Generalidades sobre ecotoxicología. Capítulo de libro *En Principios de Genética Toxicológica*. (*Mudry, M Carballo M. Ed*) Buenos Aires, Editorial de los Cuatro Vientos, pp: 393-421 (ISBN 987-564-563-X).

Fleeger John W., Carman Kevin R., Nisbet Roger M. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. The Science of the Total Environment, 317: 207–233. doi:10.1016/S0048-9697(03)00141-4

Folmar, L.C., Sanders, J.O., Julin, A.M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. Arch. Environ. Contain. Toxicol., 8: 269–278.

Forbes V. E. y T. L. Forbes. (1994). Ecotoxicology in Theory and Practice. Ecotoxicology Series 2. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 HN, UK.

Forget J, Pavillon JF, Menasria MR, Bocquene G. (1998). Mortality and LC_{50} values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. Ecotoxicol Environ Saf, 40: 239–44. doi:10.1006/eesa.1998.1686

Forschler, B.T., All, J.N., Gardner, W.A. (1989). *Steinernema feltiae* activity and infectivity in response to herbicide exposure in aqueous and soil environments. J. Invertebr. Pathol., 55: 375–379.

Fraysse Benoit, Raphael Mons y Jeanne Garric. (2006). Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. Ecotoxicology and Environmental Safety, 63: 253-267.

Gagneten, Ana María. (2002). Respuesta de una comunidad zooplanctónica de agua dulce a la aplicación de cromo en clausuras expeimentales. Interciencia. 27, 10: 563-569.

Gagneten, Ana María y Marchese, Mercedes. (2003). Effecto of Paraquat on freshwater zooplankton and zoobenthic assemblages in enclosure experiments. Ecohydrology and Hydrobiology.,3, 4: 389-398.

García, M. E. (2008). Tesis: Estudio del efecto de la contaminación sobre invertebrados del complejo zoobentónico en arroyos de la llanura pampeana. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP.

García, M.E., Rodrígues Capítulo A., Ferrari, L. (2010). Age-related differential sensitivity to cadmium in *Hyalella curvispina* (Amphipoda) and implications in ecotoxicity studies. Ecotox. Environ. Saffety, 73: 771–778.

Gheorghiu Cristina, Joanne Cable, David J. Marcogliese, Marilyn E. Scout. (2007). Effects of waterborne zinc on reproduction, survival and morphometrics of *Gyrodactylus turnbulli* (Monogenea) on guppies (*Poecilia reticulata*). International Journal for Parasitology, 37: 375–381.

Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for roundup (R) herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 167: 35–120.

Gil Verónica y Campo de Ferreras Alicia M. (2006). Caracterización morfológica sectorizada del río Sauce Grande, provincia de Buenos Aires, Argentina. Morphological characterization in two stretches of the Sauce Grande River, Buenos Aires province, Argentina. Revista Geográfica de Valparaíso, Nº 38 (Semestre 2- 2006) ISSN 0716-1905 (19-28).

Gil, Verónica y Campo de Ferreras, Alicia M. (2006). b) Procesos de vertiente en el área del Abra de la Ventana. Partido de Tornquist, provincia de Buenos Aires. Actas VI Jornadas Nacionales de Geografía Física. UNPA. Río Gallegos. ISBN 987-1242-10-7. Pp. 59-65.

Gil, Verónica y Campo, Alicia M. (2007). Carta geomorfológica de la cuenca del arroyo Del oro, Buenos Aires, Argentina. XXVIII Congreso Nacional y XIII Congreso Internacional de Geografía. Sociedad Chilena de Estudios Geográficos. Universidad de Chile. Resumen expandido en prensa

Giusto, A, y L. Ferrari. (2008). Copper toxicity on juveniles of *Hyalella pseudoazteca* González and Watling, 2003. Bull. Environm. Contam. Toxicol,. 81, (2): 169-173. ISSN 0007-4861

González P. (2004). Riesgos químicos por uso de plaguicidas en el medio ambiente. Recopilado y realizado para FSAP (Federació de Serveis i Administracions Públiques) por Pau González.

Gopalakrishnan S., Thilagam H, Vivek Raja P. (2008). Comparison of heavy metal toxicity in life stages (spermiotoxicity, egg toxicity, embryotoxicity and larval toxicity) of *Hydroides elegans*. Chemosphere, 71: 515-528. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.062

Hanelt, B. and J. J. Janovy. (1999). The life cycle of a horsehair worm, *Gordius robustus* (Gordioidea: Nematomorpha). Journal of Parasitology, 85: 139-141.

Hanelt, B., Grother, L. E. and Janovy, J., Jr. (2001). Physid snails as sentinels of freshwater nematomorphs. Journal of Parasitology, 87: 1049-1053.

Hanelt, B. and J. J. Janovy. (2003). Spanning gap: experimental determination of paratenic specificity of horsehair worms (Gordiida: Nematomorpha). Invertebrate Biology, 122: 12-18.

Hanelt, B., Janovy Jr., J. (2004). Untying a Gordian knot: the domestication and laboratory maintenance of a Gordian worm, *Paragordius varius* (Nematomorpha: Gordiida). J. Nat. Hist., 39: 939–950.

Hanelt B, Thomas F, Schmidt-Rhaesa A. (2005). Biology of the phylum Nematomorpha. Adv Parasitol., 59: 243–305. doi:10.1016/S0065-308X(05)59004-3

Hernandez, D.A., Lombardo, R.J., Ferrari, L., Tortorelli, M.C. (1990). Toxicity of ethil paration and Carbaryl on early development of sea urchin. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 45 (5):734 741. ISSN 0007-4861

Hildebrand, L.D., Sullivan, D.S., Sullivan, T.P. (1982). Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup herbicide. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 11: 93–98.

Hu, Ya-Ou, Yang Wang, Bo-Ping Ye, and Da-Yong Wang. (2008). Phenotypic and Behavioral Defects Induced by Iron Exposure Can Be Transferred to Progeny in *Caenorhabditis elegans*. Biomedical and Environmental Sciences, 21: 467-473.

Hyman, L. H. (1951). IX. Class Nematomorpha. In The invertebrates pp. 455-472. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, New York.

Iannacone Oliver José Alberto, Salazar Capcha Neil y Alvariño Flores Lorena. (2003). Variabilidad del ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para evaluar cadmio, mercurio y plomo. Ecología Aplicada, 2, (1): 103-110. ISSN 1726-2216.

Inoue, I. (1958). Studies on the life history of *Chordodes japonensis*, a species of Gordiacea. I. The development and structure of the larva. Japanese Journal of Zoology, 12: 203-218.

Inoue, I. (1959). On the adult organization of *Chordodes japonensis* (a species of Gordiacea). Zoological Magazine Tokyo, 68: 151-156.

Inoue, I. (1962). Studies on the life history of *Chordodes japonensis*, a species of Gordiacea III. The modes of infection. Annotationes Zoologicae Japonenses, 35: 12-19.

IRAM (2003). Calidad ambiental- Calidad del agua –Muestreo. Parte 16: guía para el bioensayo de muestras IRAM 29012-16. 2003

Jorge R.A.D.L.V.C. and Moreira G.S. (2005). Use of sodium dodecyl sulfate and zinc sulphate as reference substances for toxicity tests with the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia). Ecotoxicology and Environmental Safety, 61, 2: 280-285. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.09.005

Jaworska Magdalena, Anna Gorczyca, Jadwiga Sepiol and Piotr Tomasik. (1997). Effect of Metal Ions On The Entomopathogenic Nematode *Heterorhabdites bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterohabditidae) Under Laboratory Conditions. Water, Air, and Soil Pollution, 93: 157-166.

Jawroska Magdalena, Piotr Tomasik. (1999). Metal-Metal interactions In Biological Systems. Part VI. Effect Of Some Metal Ions On Mortality, Pathogenicity And Reproductivity Of *Stenernema carpocapsae* and *Heterorhabdites bacteriophora* Entomopathogenic Nematodes Under Laboratry Conditions. Water, Air, and Soil Pollution, 110: 181-19.

Jergentz S., P. Pessacq, H. Mugni, C. Bonetto, R. Schulz. (2004). Linking in situbioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. Ecotoxicology and Environmental Safety, 59: 133–141.

Johnson W.W., Finley M.T. (1980). Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Resour Publ 137, Fish Wild Serv, USDI, Washington DC: 98. In: AQUIRE (Aquatic toxicity Information Retrieval) database. US Environmental Protection Agency, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Mid-Continent Ecology Division, Duluth, Minnesota

Jonker, Martijs J., Anna M. Piskiewicz, Núria Ivorra I Castellá, and Jan E. Kammenga. 2004. Toxicity of binary mixtures of cadmium-copper and carbendazim-copper to the nematode *Caenorhabditis elegans*. Environmental Toxicology and Chemistry, 23, 6: 1529–1537.

Key P.B., Fulton M.H., Scott G.I., Layman S.L., Wirth E.F. (1998) Lethal and sublethal effects of malathion on three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. Aquat Toxicol, 40: 311–322. doi:10.1016/S0166-445X(97)00068-4

Key P.B., Fulton M.H. (2006). Correlation between 96-h mortality and 24-h acetylcholinesterase inhibition in three grass shrimp larval life stages. Ecotoxicol Environ Saf, 63: 389–392. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.10.015

Khan R.A., Thulin J. (1991). Influence of pollution on parasites of aquatic animals. Advances in Parasitology, 30: 201-238. ISSN: 0065-308X.

Khangarot B.S., Ray P.K.. (1988). Studies on the toxicity of malathion to fresh water teleosts, *Channa punctatus* (Bloch) and *Puntius sophore* (Hamilton). Arch Hydrobiol, 113: 465–469.

Khangarot, B.S., Das, S. (2009). Acute toxicity of metals and reference toxicants to a freshwater ostracod, *Cypris subglobosa* Sowerby, 1840 and correlation to EC_{50} values of other test models, J. Hazard. Mater., 172, 2-3: 641-649. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.038.

Kinziger A.P., P. Cochran & J. Cochran. (2002). Additional cases of predation on horsehair worms (Phylum Nematomorpha), with a recent record for Missouri. Trans. Miss. Acad. Scien. Bull., 36: 11-13.

Kirjanova, E. S. (1959). Permeability of the cuticle in freshwater hairworms (Nematomorpha: Gordioidea). Zoologicheskii Zhurnal, 38: 509-519.

Kirsch-Volders Micheline, Vanhauwaert Annelies, Eichenlaub-Ritter Ursula, Decordier Ilse. (2003). Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicology Letters, 140,141: 63-74.

Kobayashi, Naomasa and Hideo Okamura. (2004). Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. Chemosphere, 55, 10: 1403-1412.

Kovacs, A. (1982). Sensibilita del nematode entomopathogens *Neoaplectana carpocapsae* Weiser ad antiparassitari. Atti Giorn. Fitopathol., 11–19.

Kupper T., Burkhardt M., Rossi L., Chèvre N., de Alencastro L.F., Boller M. (2005). Biocidal products in urban water systems – occurrence, fate and impacts Literature review and proposal for further studies carried out within the project Urbic. www.eawag.ch.

Lafferty K. D. (1997). Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment?. Parasitology Today, 13, 7: 251-255.

Lafferty Kevin D., Robert D. Holt. (2003) How should environmental stress affect the population dynamics of disease? Ecology Letters, 6: 654–664

Lafferty Kevin D. (2009). The ecology of climate change and infectious diseases. Ecology, 90 (4): 888–900.

Lapinska A. B., Zalewski B., y Trojanowska C. (2004). Streams & Rivers: Defining their Quaility & Absorbing Capacity. P. 75-96. En Integrated Watershed Management – Ecohydrology & Phytotechnology- Manual. Zalewski M., Wagner-Lotkowska I. y Robarts R.D. (Eds.) UNESCO.

Lazorchak, J. M., Smith, M. E., and Haring, H. J. (2009). Development and validation of a *Daphnia magna* four-day survival and growth test method. Environ. Toxicol. Chem., 28, 5: 1028-1034.

Leight A.K., Van Dolah R.F. (1999). Acute toxicity of the insecticides endosulfan, chlorpyrifos, and malathion to the epibenthic estuarine amphipod *Gammarus palustris* (Bousfield). Environ Toxicol Chem, 18: 958–964. doi:10.1897/1551-5028(1999)018\0958:ATOTIE[2.3.CO;2

Lewis, P. A., Horning II W.B. (1991). Differences in Acute Toxicity Test Results of Three Reference Toxicants on *Daphnia* at Two Temperatures. Environ. Toxicol. Chem., 10: 1351-1357.

Leydig, F. (1853). Zoologische Notizen. Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie, 4: 377-387.

Leidy, J. (1878). Notice of some worms, Dibothrium cordiceps, Hirudo, *Gordius*. Proceedings of the Academy of Natural Sciences, Philadelphia, 23: 305-307.

Li Yunhui, Wang Yang, Yin Lihong, Pu Yuepu, Wang Dayong. (2009). Using the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model animal for assessing the toxicity induced by microcystin-LR. Journal of Environmental Sciences, 21: 395–401.

Lienesch, L.A., Dumont, J.N., Bantle J.A., (2000). The effect of cadmium on oogenesis in *Xenopus laevis*. Chemosphere, 4:, 1651-1658.

Linstow, O., von (1883). Über die Zwischenwirthe des *Gordius aquaticus*. Zoologisher Anzeiger, 6: 373-374.

Linstow, O., von (1892). Beobachtung an Helminthenlarven. Archiv für mikroskopische Anatomie, 39: 325-343.

Lombardo, R.J., Ferrari, L.,Vinuesa, J.H. (1982). Efectos del Etil Paration y DDVP en larvas de centolla, *Lithodes antarcticu*s Jacquinot. Ecosur (Argentina), 9 (18):141 151

Lombardo, R.J., Ferrari, L., Vinuesa, J.H. (1991). Effects of Lindane andacetone on the development of larvae of southern King crab (*Lithodes antarcticus*, Jaquinot). Bull. Environm. Contam. Toxicol., 46 (2): 185 192. ISSN 0007-4861

López Cazorla A., N. S. Sidorkewicj y S. Forte. (2003). Edad y crecimiento de *Jenynsia lineata* en la cuenca alta del río Sauce grande, provincia de Buenos Aires. Biología Acuática, 20: 68-72.

Lorenzen, S. (1985). Phylogenetic aspects of pseudocoelomate evolution. In The Origins and relationships of lower invertebrates: proceedings of an international symposium held in London, September 1983 (eds. Conway Morris, S., George, J. D., Gibson, R. and Platt, H. M.), pp. xi, 397. Systematics Association, Clarendon Press, Oxford.

Lorenzen S. (1996). Nemathelminthes (Aschelminthes). Pp. 682- 736 in Westheide, W. & Rieger, R. (eds.) Spezielle Zoologie. Gustav Fischer Verlag.

Lund S.A., Fulton M.H., Key P.B. (2000) The sensitivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide induced acetylcholinesterase inhibition. Aquat Toxicol, 48: 127–134. doi:10.1016/S0166-445X(99)00053-3.

Mackenzie K. (1999). Parasites as Pollution Indicators in Marine Ecosystems: a Proposed Early Warning System. Mar. Pollut. Bull., 38, 11: 955-959.

Malmqvist, B. and Moravec, F. (1978). *Gordius aquaticus* larvae found in the lampreys *Lampetra planeri* (Bloch) and *L. fluviatilis* (L.). 25, 40.

Mason C.F. (1996). Biology of freshwater pollution. Third Edition. Longman Group Limited. 356 páginas.

McNulty, E.W., Dwyer, J., Ellersieck, M.R., Greer, E.I., Ingersoll, C.G., Rabeni C.F., (1999). Evaluation of ability of reference toxicity tests to identify stress in laboratory populations of the amphipod *Hyalella azteca*. Environ. Toxicol. Chem., 18, 3: 544–548.

Measures, L.N. (1996). Effect of temperature and salinity on development and survival of eggs and free-living larvae of sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) *Can. J. Fish. Aquat. Sci*., 53: 2804-2807

Min Du, Dayong Wang. (2009).The neurotoxic effects of heavy metal exposure on GABAergic nervous system in nematode *Caenorhabditis elegans*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 27: 314–320.

Miserendino, M.L. and Pizzolón, L.A. (2002). Rapid Assessment of River Water Quality Using Macroinvertebrates: A Family Level Biotic Index for the Patagonic Andean Zone. Acta Limnologica Brasiliensia, 11, 2: 137-148.

Miserendino M. L., C. Brand, C. Y. Di Prinzio. (2008). Assessing Urban Impacts on Water Quality, Benthic Communities and Fish in Streams of the Andes Mountains, Patagonia (Argentina). Water Air Soil Pollut., 194, (1-4): 91 – 110. doi: 10.1007/s11270-008-9701-4

Miralles D. B. (1981). Nueva Especie de Gordiaceo de Sierra de La Ventana. Neotropica 27: 87-90.

Miralles D. B. y Camino N. (1983). Sobre la colección de Gordeaceos del Museo Bernardino Rivadavia. Neotropica, 29: 51-56.

Miralles D. B. (1984). Estudio sobre Gordeaceos argentinos. Revista del Museo de La Plata, 13: 283-289.

Miralles, D. (1989). Estructura cuticular de *Chordodes carmelitanus* Carvalho y Feio, 1950 nueva cita para la Argentina (Nematomorpha Chordodidae). Neotropica, 35: 95-99.

Miralles, D. and C. de Villalobos. (1993). Gordioidea: Distribución en la Argentina y la Región Neotropical. Fauna de Agua Dulce de la República Argentina, 13 (2- 3): 5-32.

Miralles, D. y de Villalobos, C., (1996)a. Dos nuevas especies de Gordiáceos para Ventania, Argentina (Nematomorpha). Comun. Mus. Cienc. Tecnol. PUCRS Ser. Zool. Porto Alegre, 9: 3-9.

Miralles, D. y de Villalobos, C., (1996)b. Especies de *Neochordodes* Carvalho, 1942 de la Argentina (Gordiacea Nematomorpha). Iheringia Ser. Zool. Porto Alegre, (81): 145-150.

Miralles D, de Villalobos, C. y Rodriguez A. (1997). Una nueva especie y una nueva combinación de Gordiaceos (Nematomorpha). Neotrópica, 43 (109-110): 53-56.

Montgomery, T. H. (1904). The development and structure of the larva of *Paragordius*. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia. 56: 738-755.

Moriarty F.. (1988). Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems. 2º Edición. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.

Müller, G. W. (1920). Beobachtung an Gordius. Zoologischer Anzeiger, 51: 225-229.

Murillo, N., Diaz, M.C. (2002). Evaluación de la toxicidad de Cr^{+6}, Cu^{+2} y el efluente de un cromado de una industria metalmecánica utilizando *Panagrellus redivivus* como organismo de prueba. Ingeniería e Investigación, 051, 38, 5-16. Unidad de Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. www.ictes.gov.co/revistas/ingeinve/No. 38/Art.1.html

Natale Guillermo Sebastián. (2006). Tesis: Analisis ecotoxicologico de una comunidad de anuros de la region pampeana. Efecto del Cr (VI) sobre embriones y larvas de distintas especies de una taxocomunidad. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP. 312 páginas.

Nebeker, A.V., Onjukka, S.T., Cairns, M.A., Krawczyk, D.F. (1986). Survival of *Daphnia magn*a and *Hyalella azteca* in cadmium-spiked water and sediment. Environ. Toxicol. Chem., 5: 933-938.

Newman, M.C. (2001). Fundamentals of Ecotoxicology. Lewis Publischers

Nielsen, C. (2001). Animal Evolution. Interrelations of the living Phyla. Oxford University Press. 562 pp.

Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Carbendazim. Desarrollos de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Correspondientes a Carbendazim. Julio 2004. República Argentina. Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación**.** www.obraspublicas.gov.ar/hidricos/documentos/calidad/ 2003 (2006).

Norberg-King, T.J., (1993). A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach (Version 2.0). US Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, Duluth.

Ong, E.S., Din, Z.B., (2001). Cadmium, copper, and zinc toxicity to the clam, *Donax fava* C., and the blood cockle, *Anadara granosa* L. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 66, 86–93.

Overmyer J.P., Armbrust K.L., Noblet R. (2003). Susceptibility of black fly larvae (Diptera: Simuliidae) to lawn-care insecticides individually and as mixtures. Environ Toxicol Chem, 22: 1582–1588. doi:10.1897/1551-5028(2003)22\1582:SOBFLD[2.0.CO;

Palawski Donald U. and Knowles Charles O. (1986). Toxicological studies of benomyl and carbendazim in rainbow trout, channel catfish and bluegills. Environmental Toxicology and Chemistry, 5: 1039-1046.

Pagano Giovanni, Agostino Esposito, Patrizia Bove, Marialuisa de Angelis, Annamaria Rota and Giovan Giacomo Giordano (1983). The effects of hexavalent and trivalent chromium on fertilization and development in sea urchins. Environmental Research,30,2: 442-452.

Pandey S., Kumar R., Sharma S., Nagpure N.S., Srivastava S.K., Verma M.S. (2005). Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air-breathing fish *Channa punctatus* (bloch). Ecotoxicol Environ Saf, 61: 114–120. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.08.004

Pathiratnea A., George S.G. (1998). Toxicity of malathion to nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants. Aquat Toxicol, 43: 261–271. doi:10.1016/S0166-445X(98)00059-9.

Pérez Leiva Félix y Anastasio Mario Daniel. 2005. Consumo de fitosanitarios en el contexto de expansión agrícola. Apuntes Agroeconómicos Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires. Año 4. Nº 5.

Perkins, P.J., Boermans, H.J., Stephenson, G.R. (2000). Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay- Xenopus. Environ. Toxicol. Chem., 19: 940–945.

Persoone Guido, David Calamari and Peter Wells. (1990). “Chapter 18 Possibilities and Limitations of Predictions from Short-term Tests in the Aquatic Environment.” En Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects. Edited by P. Bourdeau et al. © 1990 SCOPE. Published by John Wiley & Sons Ltd.

Peterson, H.G., Boutin, G., Martin, P.A., Freemark, K.E., Ruecker, N.J., Moody, M.J. (1994). Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. Aquat. Toxicol., 28: 275–292.

Pietrock, M, D. J. Marcogliese and J. D. McLaughlin. (2002). Effects of cadmium upon longevity of *Diplostomum* sp. (Trematoda: Diplostomidae) cercariae. Chemosphere. 47, 1: 29-33

Pietrock, M, D. J. Marcogliese, Meinelt, T. and J. D. McLaughlin. (2002). Effects of mercury and chromium upon longevity of *Diplostomum* sp. (Trematoda: Diplostomidae) cercariae. Parasitol. Res. 88: 225-229.

Pietrock Michael and David J. Marcogliese. (2003). Free-living endohelminth stages: at the mercy of environmental conditions. TRENDS in Parasitology, 19, 7: 293-299.

Popham, J.D. and Webster, J.M. (1979). Cadmium toxicity in the free nematode *Caenorhabilis elegans*. Environ, Res, 20: 183-191.

Ponton F., C. Lebarbenchon, T. Lefébre, F. Thomas, D. Duneau, L. Marché, L.Renault, D. Hughes & D. Biron. (2006). Hairworm anti-predator strategy: a study of causes and consequences. Parasitol., 133: 631-638.

Protasoni, M., de Eguileor, M., Congiu, T., Grimaldi, A. and Reguzzoni, M. (2003). The extracellular matrix of the cuticle of *Gordius panigettensis* (Gordioiidae, Nematomorpha): observations by TEM, SEM and AFM. Tissue Cell, 35: 306-311.

Rajaram, B., and G. S. Rajulu (1975). A study of the cuticle of *Gordius robustus*, a nematomorph worm. Acta Histochem., 54: 257-271.

Rand G. M., P. G. Wells, and L.S. McCarty. (1995). Chapter 1. Introduction to Aquatic Toxicology. En Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Segunda Edición. Editado por G. M. Randme.

Relyea Rick A. (2004). Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. Environmental Toxicology and Chemistry, 23, 7: 1737–1742.

Relyea R.A. (2005). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. Ecological Applications, 15, 2: 618-627.

Reutter, K. (1972). Gordius das Wasserkalb. Mikroskosmos, 61: 198-204.

Rodrigues Capítulo A. (1999). Los macroinvertebrados como indicadores de la calidad de ambientes lóticos en el área Pampeana. Rev Soc Entomol Argent., 58: 208–217.

Rodrigues Capítulo A., Tangorra M., Ocon C. (2001). Use of benthic macroinvertebrates to assess the biological status of Pampean streams in Argentina. Aquat Ecol, 35: 109–119. doi:10.1023/A:1011456916792

Ronco A. E., Castillo G., Díaz M.C. (2000a). Development and application of microbioassays for routine testing and biomonitoring in Argentina, Chile and Colombia. Chapter 1: Reviews on toxicity tests, Contribution 5. New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring. Persoone G., Janseen C. & De Coen W. (Eds.). Kluwer Acad./Plenum Publish., London, 2000, p 49-61.

Ronco A.E., Sobrero C., Gras V., Kaminski L., Massolo L., Mina L. (2000b). Watertox bioassay intercalibration network: results from Argentina, Environ. Toxicol., 15: 287-296.

Ronco A.E., Díaz Báez C., Pica Granados Y. (2004). Conceptos generales. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de la calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Castillo Morales, G. y Castillo G. (Eds.) México; pp 17-22.

Ruiz V. & R. Figueroa. (2005). Primer registro de Nematomorpha Gordiida en contenidos estomacales de peces de ríos chilenos. Bol. Soc. Biol. Concepción., 76: 57-60.

Sabo, Rastislav, Lucia SABOVÁ, Jaroslav LEGÁTH. (2009). The use of parasites as bioindicators of pesticide exposure. Interdisc Toxicol., 2, 3: 187–189. doi: 10.2478/v10102-009-0015-1

Salas, Liliana. Tesis. (2008). "Gordiida (Nematomorpha) de la Argentina, diversidad y distribución". Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. UNCA.

Salas, L., de Villalobos C. & Zanca F. (2010). Sexual size dimorphism, sex ratio and the relationship between seasonality and wáter quality in four species of Gordiida (Nematomorpha) from Catamarca, Argentina. Journal of Helmintology, 85: 1-13

Salibián A. (2006). Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 185: 35-65.

Samoiloff, M.R., S. Schultz, Y. Jordan, K. Denich and E. Arnott. (1980). A Rapid Simple Long-Term Toxicity Assay for Aquatic Contaminants Using the Nematode *Panagrellus redivivus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37, 7: 1167–1174.

Sawyre, R. T. (1971). Eurobdellid Leeches as New hosts for the Nematomorph, *Gordius* sp. J. Parasitol., 57: 285.

Schmidt- Rhaesa, A. (1997). Nematomorpha. *In*: Süßwasserfauna von Mitteleuropa. G. Fischer Stuttgart ed. 1-123.

Schmidt-Rhaesa A. (1999). Phylogenetic Relationships of the Nematomorpha a discussion of current hypotheses. Zool. Anz., 236: 203-216.

Schmidt-Rhaesa A. (2001). The life cycle of horsehair worms (Nematomorpha). Acta Parasitologica, 46: 151-158.

Schmidt-Rhaesa A. and Ehrmann R. (2001). Horsehair worms (Nematomorpha) as –parasites of praying mantids with a discussion of their life cycle. Zool. Anz., 240: 167-179.

Schmidt-Rhaesa A. (2002). Australian species of *Chordodes* (Nematomorpha) with a description of two new species, remarks on the genus *Chordodes* and its life history. J Nat Hist, 36: 1569-1588.

Schmidt- Rhaesa A. & de Villalobos L. C. (2002). Revision of the genus *Beatogordius* (Gordiida, Nematomorpha)I. African species with inclusion of *Chordodiolus echinatus* (Linstow 1901). Annals du Museu Royale de l´Africa Centrale, Serie Zoologie, 290: 1-25.

Segura-Muñoz, S.I, Beltramini Trevilato, T.M., Takayanagui, A.M.M., (2003). Metales pesados en agua de bebederos de presión. ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICIÓN. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 53, 1: 59-64.

Seoánez Calvo, Mariano. (1996). Ingeniería del medio ambienta aplicada al medio Natural continental. La contaminación del medio natural continental: aire, aguas, suelos, vegetación y fauna: Tecnologías de identificación, lucha y corrección. Coedición Ediciones Munci-Prensa, Análisis y Trabajos Prospectivos, S.L. Distribución Grupo Mundi-Prensa. Páginas 701.

Servizi, J.A., Gordon, R.W., Martens, D.W. (1987). Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia*, and trout. B. Environ. Contam. Tox., 39: 15–22.

Silva Jeannette, Torrejón Guillermo, Bay-Schmith Enrique y Larrain Alberto. (2003). Calibracion del bioensayo de toxicidad aguda con *Dapnia pulex* (Crustacea: Cladocera) usando un toxico de referencia. Gayana, 67, 1: 87-96, ISSN 0717-652X.

Silva, J., Fuentealba, C., Bay-Schmith, E., Larrain, A. (2007). Estandarizacion del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un toxico de referencia. Standarization of the acute toxicity bioassay with *Diplodon chilensis* using a reference toxicant. Gayana, 71, 2: 135-141, ISSN 0717-652X.

Singer, M.M., Tjeerdema, R.S. (1993). Fate and Effects of the Surfactant Sodium Dodecyl Sulfate. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 133: 95-149.

Sokal Robert R. y F. James Rohlf. (2002). Introducción a la Bioestadística. Editorial Reverté, S.A. pp. 362.

Solomon Keith R., Thompson Dean G. (2003). Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of Glyphosate. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 6: 289–324. doi: 10.1080/15287390390155571.

Sparling D.W., Fellers G. (2007). Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylii*. Environ Pollut, 147: 535–539. doi:10.1016/j.envpol.2006.10.036

Spiridonov, S. E. (1989). Current knowledge on Gordiacea. Byulleten' Vsesoyuznogo Instituta Gel'mintologii im. K. I. Skryabina. 90-91.

Spiro T.G., Stigliani W.M. (2004). Química medioambiental. Pearson Educación, S.A., Rivera del Loira, Madrid. pp 504.

Sures B., Siddall R. and Taraschewski H. (1999). Parasites as Accumulation Indicators of Heavy Metal Pollution. Parasitology Today, 15, 1: 16-21.

Sures Bernd. (2001). The use of fish parasites as bioindicators of heavy metals in aquatic ecosystems: a review. Aquatic Ecology, 35: 245–255.

Sures B. (2003). Accumulation of heavy metals by intestinal helminthes in fish: an overview and perspective. Parasitology, 126: S53-S60. doi: 10.1017/S003118200300372X.

Sures B., S. Zimmermann, C. Sonntag, D. Stüben, H. Taraschewski. (2003). The acanthocephalan *Paratenuisentis ambiguus* as a sensitive indicator of the precious metals Pt and Rh from automobile catalytic converters. Environmental Pollution, 122: 401–405.

Sures Bernd. (2004). Review: “Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution.” Trends in Parasitology, 20,.4: 170-177.

Sures B. (2008). Environmental parasitology. Interactions between parasites and pollutants in the aquatic environment. Parasite, 15: 434-438.

Swanson C.J. (1982). Nematomorpha. In: (Ed. S.P. Parker) Synopsis and Classification of Living Organisms. Vol. 1. McGraw-Hill, New York, 931–932.

Téllez, J., Carvajal Rox, M., Gaitán, A.M. (2004). Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres / Tannery chromium utilization in Colombia and its toxic implications. Rev. Fac. Med. (Bogotá), 52, 1: 50-61.

Thielen, F., S. Zimmermann, F. Baska, H. Taraschewski, B. Sures. (2004). The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel as a bioindicator for metal pollution in the Danube River near Budapest, Hungary. Environmental Pollution, 129: 421–429.

Thomas, F., Schmidt-Rhaesa, A., Martin, G., Manu, C., Durand, P. and Renaud, F. (2002). Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial hosts? Journal of Evolutionary Biology, 15: 356-361.

Toussaint, M.W., Shedd, T.R., Van der Schalie, W.H., Leather G.R. (1995). A Comparison of Standard Acute Toxicity Tests with Rapid-Screening Toxicity Tests. Environ. Toxicol. Chem., 14, 5: 907-915.

Thorne G. (1940). The hairworm *Gordius robustus* Leidy as a parasite of the mormon cricket *Anabrus simplex* Haldeman. Journal of the Washington Academy of Sciences, 30: 219-231.

TOXSTAT software package version 3.5., 1996.West Inc. & University of Wyoming Department of Zoology and Physiology.

Tsuda, T., Kojima M., Harada H., Nakajima A., Akoi S. (1997). Acute toxicity, accumulation and excretion of organophosphorus insecticides and there oxidation products in killifish. Chem (Kyoto,) 35: 939–949.

Tsui, M.T.K., Chu, L.M., (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere 52 (7), 1189–1197.

Tsui, M.T.K., Chu, L.M. (2004). Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: Aqueous and sediment porewater exposures. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 46: 316–323.

Tsui, M.T.K., Wang, Wen-Xiong, Chu, L.M. (2005). Influence of glyphosate and its formulation (Roundup) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. Environ. Pollut., 138: 59-68.

Tyler Miller G., Jr. (1994). Ecología y Medio Ambiente. Introducción a la Ciencia Ambiental, el Desarrollo Sustentable y la Conciencia de Conservación del Planeta Tierra. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V. ISBN 970-625-027-1. Versión en español de la obra Living in Environment – An Introduction to Environmental Sience. G. Tyler Miller, Jr. / Seventh Edition. Edición original en inglés publicada por Wadsworth Publishing Company. 1992 en Estados Unidos de América

USEPA ECOTOX Data Bank, AQUIRE (Aquatic toxicity Information Retrieval) database. U.S. Environmental Protection Agency, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Mid-Continent Ecology Division, Duluth, Minnesota, USA. http/www.epa.gov/ecotox. ECOTOX Database. www.cfpub.epa.gov/ecotox/

US EPA Environmental Protection Agency (EPA). (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluent and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms: 4th Ed: Weber, C.I. Ed., EPA-600/4-90-027.

USEPA. (1994). Short –term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to fresh organisms. Third Edition. Washington, D.C.

USEPA. (2006). Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion. United States Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances EPA 738-R-06-030 July 2006 (7508P) Debra Edwards, Ph.D. Director, Special Review and Reregistration Division

US EPA. (2007). Framework for metals risk assessment. EPA 120/R-07/001 Washington DC Office of the Science Advisor.

Van den Brink Paul J., Jasper Hattink, Fred Bransen, Ellen Van Donk, Theo C.M. Brock. (2000). Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. II. Zooplankton, primary producers and final conclusions. Aquatic Toxicology, 48: 251–264.

van Wijngaarden R.P.A., S.J.H. Crum, K. Decraene, J. Hattink and A. van Kammen. (1998). Toxicicity of derosal (active ingredient carbendazim) to aquatic invertebrates. Chemosphere, 37, 4: 673-683,

Varela bruce, Ramón Alejandro. 2005. Tesis: "Determinación del nivel de toxicidad aguda del fungicida carbendazim y el herbicida 2,4 d mediante bioensayos con *Galaxias maculatus*". Facultad de Recursos Naturales de la Universidad Católica de Temuco. Tesis Para Optar al Grado de Licenciado en Recursos Naturales. 77 páginas.

Vázquez R. J. L y Fernández O.A. (2005). La sustentabilidad del recurso agua para Bahía Blanca. Procesos hidrológicos y biogeoquímicos en el sistema Sauce Grande-Paso de las Piedras. AgroUNS, Año 2, Nº 3, páginas 5-9.

Vera María S., Leonardo Lagomarsino, Matías Sylvester, Gonzalo L. Pérez, Patricia Rodríguez, Hernán Mugni, Rodrigo Sinistro, Marcela Ferraro, Carlos Bonetto, Horacio Zagarese, Haydé Pizarro. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. Ecotoxicology, 19:710–72. doi 10.1007/s10646-009-0446-7

Villot, A. (1874). Monographie des Dragonneaux. Arch. Zool. Exp. Gen., 3: 38-72 & 181-238.

Villot, A. (1891). L'évolution des Gordiens. Annales Sc. nat. Zoologie, 59: 329-401.

von Westernhagen H., (1988). Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In: W.S. Hoar and D.J. Randall, Editors, Fish Physiology vol. XIA, Academic Press, San Diego (1988), 253–346.

Vouilloud A.A., Sala S.E., Sabbatini M.R. (2005). Diatomeas perifíticas de la cuenca del Río Sauce Grande (Buenos Aires, Argentina). IHERINGIA Ser Bot Porto Alegre, 60: 77–89.

Wang Dayong, Lulu Shen, Yang Wang. (2007). The phenotypic and behavioral defects can be transferred from zinc-exposed nematodes to their progeny. Environmental Toxicology and Pharmacology, 24: 223–230. doi:10.1016/j.etap.2007.05.009

Wang Dayong, Xing Xiaojuan. (2008) Assessment of locomotion behavioral defects induced by acute toxicity from heavy metal exposure in nematode *Caenorhabditis elegans*. Journal of Environmental Sciences, 20: 1132–1137.

Willuhn Jörg, Andreas Otto, Heike Koewius and Frank Wunderlich. (1996). Subtoxic cadmium-concentrations reduce copper-toxicity in the earthworm Enchytraeus buchholzi. Chemosphere, 32, 11: 2205-2210. doi:10.1016/0045-6535(96)00122-1.

Williams G.M., Kroes R., Munro I.C., (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup® and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regul. Toxicol. Pharm., 31: 117–165.

Whittaker F.H., Barker R.L. (1983). Some observations on the egg string of a nematomorph worm *Paragordius* sp. Transactions of the Kentucky Academy of Science, 44: 76-77.

Woelke, C.E., (1972). Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster, *Crassostrea gigas* embryo. Wash. Dept. Fish. Tech. Rep., 9: 1–93.

Wu, Y., Lin, C. and Yuan, L. (2007). Characteristics of six cladocerans in relation to ecotoxicity testing. Ecological Indicators. 7: 768–775.

www.cricyt.edu.ar/enciclopedia, 2009

www.inta.gov.ar

www.inta.gov.ar. INTA, hoja informativa electrónica EEA Concepción del Uruguay.

www.inta.gov.ar. INTA, HOJA INFORMATIVA ELECTRÓNICA EEA CONCEPCIÓN DEL URUGUAY. INTA - Concepción del Uruguay - El trigo y las enfermedades foliares. Página del INTA Concepción del Uruguay, Hojas Informativas Electrónicas que contienen información técnica sobre agricultura en vertisoles,

ganadería, avicultura y horticultura. www.inta.gov.ar/concepcion/informacion/boletines/hie/01/16.

www.inta.gov.ar. Babbitt S. B.; M.V. Brambilla ; V. Saliva ; M. Barbieri ; E. Piris ; E. Krumpholtz ; A. Fasce ; M.S. Mitidieri. (2006). Resistencia a Carbendazim en cepas de *Monilinia fructicola* provenientes de un monte de duraznero.

www.inta.gov.ar/concordia/info/boletines/boletinfruticolas/Boletinfruticola_119.pdf Bello F. (2008). Actividades en postcosecha de arándanos. Boletín: "Novedades Frutícolas EEA Concordia". INTA. Año VI-N´º 119.ISSN 1666-5392. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

www.inta.gov.ar. Mitidieri M. (2005). Control de podredumbre morena en duraznero. www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/2005/mm_0503.htm.

www.inta.gov.ar/parana/info/documentos/produccion_vegetal/soja/enfermedades/fung_enf_soja.htm. Resistencia a Carbendazim en cepas de *Monilinia fructicola* provenientes de un monte de duraznero. Trabajo presentado en: XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Facultad de Ciencias Agrarias. U.N. Catamarca. Catamarca, 28 al 30 de junio de 2006. INTA Paraná - Fungicidas para Enfermedades de fin de ciclo en el Cultivo de Soja. Descripción: Estación Experimental Agropecuaria Paraná del INTA.

www.inta.gov.ar. Fernández R.. 2002. UEEA Gran Buenos Aires. Agroquímicos registrados para floricultura. www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/orn/rf_001.htm.

www.inta.gov.ar. Gamboa S., A. Mitidieri , A. Aprea, M.C. López, M. A. Sangiacomo, J.C. Zembo. 1999. Cultivares de frutilla de día corto. Su comportamiento en el Cinturón Hortícola del Gran La Plata. www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/hor/amh_006.htm

www.inta.gov.ar. Paunero I.E.. 2007. Cultivo intensivo de zapallo anquito (*Cucurbita moschata* Duch.) en el noreste bonaerense. http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/2007/ip_0703.htm.

www.obraspublicas.gov.ar/hidricos/documentos/calidad/ 2003. (2006)

Zabaloy M.C., Garland J.L., and Gómez M.A. (2008). An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. Applied Soil Ecology, 40. 1-12.

Zanca F. 2003. Tesis: Gordiida (Nematomorpha) de la República Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP

Zanca F., de Villalobos C., Rumi A. (2007). Larval survival strategy during winter of *Chordodes nobilii* Camerano, 1901 (Gordiida Nematomorpha). Acta Parasitologica, 52: 382-385. doi: 10.2478/s11686-007-0055-7.

Zapotosky J. E. (1971). The cuticular ultrastructure of *Paragordius varius* (Leidy, 1851) (Gordioidea, Chordodidae). Proc. Helminthol. Soc. Wash., 38: 228-236.

Zapotosky, J.E. (1974) Fine structure of the larval stage of *Paragordius varius* (Leidy, 1851) (Gordioidea, Paragordidae). I. The preseptum. Proc. Helminthol. Soc. Wash., 41: 209-221.

Zapotosky, J. E. (1975). Fine structure of the larval stage of *Paragordius varius* (Leidy, 1851) (Gordioidea, Paragordidae). II The postseptum. Proc. Helminthol. Soc. Wash., 42: 103-111.

Zar, J.H. (1999). Biostatistical analysis. Prentice Hall, N.J.

Zavala, Carlos y Quattrocchio, Mirta. (2001). Estratigrafía y evolución geológica del río Sauce Grande (Cuaternario), provincia de Buenos Aires, Argentina. Revista de la Asociación Geológica Argentina, 56, 1: 25-37.

Zuck M., Kim T., Kristan D.M. and Luong L.T. (1997). Sex, Pain and Parasites. Parasitology Today, 13, 9: 332-333