EFECTOS DEL CLORURO DE MERCURIO ($HgCl_2$) SOBRE LA SOBREVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE RENACUAJOS DE *DENDROSOPHUS BOGERTI*

EFFECTS OF MERCURY CHLORIDE ($HGCL_2$) ON THE SURVIVAL AND GROWTH OF TADPOLES OF *DENDROSPHUS BOGERTI*

Eliana M. Muñoz-Escobar[1, 3], Jaime A. Palacio-Baena[1, 2, 4]

Resumen

Larvas de la rana *(Dendrosophus bogerti)* fueron expuestas a cinco concentraciones letales (0,25, 0,3, 0,36, 0,43 y 0,51 mg/l) y cuatro subletales (0,02, 0,04, 0,08 y 0,10 mg/l) de cloruro de mercurio **($HgCL_2$)** con el fin de determinar la CL_{50}, los efectos sobre el crecimiento y sobre la tasa de desarrollo. La CL_{50} 96 h del $HgCl_2$ fue 0,41 mg/l. Se evidenció un efecto del Hg sobre el crecimiento (peso y longitud) a los 10 y 20 días de exposición a 0,04, 0,08 y 0,1 mg/l $HgCl_2$ con un $P < 0,001$. En contraste, el peso y la longitud de los renacuajos expuestos a 0,02 mg/l $HgCl_2$ no mostraron diferencias significativas con el control negativo ($P = 0,77$ y $P = 0,1$, respectivamente). La mayor inhibición del crecimiento se observó a los 30 días ($P < 0,001$). En el tiempo para alcanzar el estadio 36 de Gosner se encontraron diferencias significativas en todos los ejemplares tratados con Hg con respecto al control ($H = 35,4$, $P < 0,001$). El retraso en el desarrollo puede estar relacionado con la alteración enzimática y en la naturaleza presenta consecuencias negativas en la sobrevivencia de los renacuajos debido a la rápida desecación de las charcas temporales y vulnerabilidad a depredadores. La especie *D. bogerti* es sensible a la exposición del mercurio en ambientes acuáticos, con efectos desfavorables sobre el crecimiento y la tasa de desarrollo.

Palabras clave: cloruro de mercurio, crecimiento, *Dendrosophus bogerti,* metamorfosis, renacuajos

Abstract

Frog larvae (*Dendrosophus bogerti*) were exposed to five lethal (0.25, 0.3, 0.36, 0.43, and 0.51 mg/l) and four sublethal concentrations (0.02, 0.04, 0.08, and 0.10 mg/l) of mercury chloride **($HgCl_2$)**, in order to determine the LC_{50} and effects on growth and development rates. The LC_{50} at 96 h of $HgCl_2$ was 0.41 mg/l. There was evidence for an effect of Hg on growth (weight and length) at 10 and 20 days of exposure to 0.04, 0.08, and 0.1 mg/l $HgCl_2$ with a $P < 0.001$. In contrast, weight and length of tadpoles exposed to 0.02 mg/l $HgCl_2$ showed no significant differences with the negative control ($P = 0.77$ and $P = 0.1$, respectively). The highest growth inhibition was observed at 30 days ($P < 0.001$). The time to reach Gosner stage 36 was significantly different in all specimens treated with Hg compared to controls ($H = 35.4$, $P < 0.001$). The delay in development may be related to an enzymatic alteration and in nature may have a negative impact on the survival of tadpoles due to rapid drying of temporary ponds and increased vulnerability to predators. The species *D. bogerti* is sensitive to mercury exposure in aquatic environments, with adverse effects on growth and development rate.

Key words: *Dendrosophus bogerti,* growth, mercuric chloride, metamorphosis, tadpoles

Recibido: mayo 2009; aceptado: octubre 2010.

[1] Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental **(GAIA).** Sede de Investigación Universitaria **(SIU),** Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

[2] Docente. Departamento de Ingeniería Sanitaria, Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia. Correos electrónicos: [3] <emmunoz12@yahoo.es>, [4] <japalaci@udea.edu.co>.

INTRODUCCIÓN

Entre las posibles causas del descenso de las poblaciones de anfibios en el mundo se señalan la alteración o destrucción de los hábitats naturales, la introducción de especies exóticas, las enfermedades infecciosas, la radiación ultravioleta, el calentamiento global y la presencia de sustancias químicas en el ambiente (Christin et al. 2004, Collins y Storfer, 2003, Hayes et al. 2002, Rouhani et al. 2005).

La minería artesanal del oro en Colombia, ha favorecido el enriquecimiento de los ecosistemas acuáticos con mercurio **(Hg)** (Marrugo et al. 2008). Se calcula que por cada kilogramo de oro, al menos 1,32 kg de Hg son vertidos al ambiente, ya que para amalgamar el oro se usa una relación Hg/Au hasta 6:1 y en algunos casos 10:1 (Malm et al. 1990). No obstante, en áreas alejadas de las actividades mineras se ha estimado bajas concentraciones de Hg en el agua entre 0 y 0,003 mg/l (Marrugo y Lans 2006).

Por su naturaleza el Hg presenta alta persistencia en el ambiente, se bioacumula y biomagnifica y actúa como un disruptor endocrino en muy bajas concentraciones. El ingreso de Hg a los anuros ocurre a través de la superficie del cuerpo por absorción directa desde el agua, consumo de sedimento, absorción del aire durante la respiración y a través de la cadena alimenticia (Albrecht et al. 2007, Bulog et al. 2002, Burger y Snodgrass 2001, Lefcort et al. 1998, Sparling et al. 2006).

El Hg inhibe o estimula algunas enzimas y se acumula, conjuntamente con otros cationes esenciales para el organismo en los lisosomas (Loumbourdis y Danscher 2008). Debido a su alta afinidad por los grupos sulfhidrilos **(SH)** este metal inhibe los puentes disulfuros y causa un cambio en la estructura y función de las proteínas (Bridges y Zalups 2005, Loumbourdis y Danscher 2008). En larvas de anfibios expuestos a Hg, se han identificado malformaciones (Unrine et al. 2005), efectos negativos sobre la sobrevivencia, crecimiento y metamorfosis (Unrine et al. 2004, 2005, Unrine y Jagoe 2004), cambios en el comportamiento (Lefcort et al. 1998) y alteraciones en el sistema enzimático (Loumbourdis y Danscher 2008).

Aunque Colombia es el segundo país más rico en anfibios y estos organismos son considerados excelentes indicadores de la calidad del ambiente por la amplia variedad de respuestas a sustancias contaminantes (Unrine et al. 2005, 2007), las investigaciones en este tema en nuestro país son aún incipientes. Por lo anterior, el trabajo busca determinar los efectos letales y subletales del Hg en larvas de *Dendrosophus bogerti.*

MATERIALES Y MÉTODOS

El cloruro de mercurio **($HgCl_2$)** es una sal soluble en el agua, de peso molecular 271,52, punto de fusión 276 °C y punto de ebullición 303 °C (Palacio et al. 2002). El $HgCl_2$, es muy tóxico para los organismos acuáticos y es empleado en la industria agrícola como fungicida e insecticida.

La especie *Dendrosophus bogerti* es una rana endémica de Antioquia (Colombia) ampliamente distribuida en el Valle de Aburrá, habita entre 1.250 y 2.580 msnm, se reproduce en charcas temporales de zonas intervenidas (Palacio et al. 2006) y su desarrollo larval oscila entre 40 y 60 días bajo condiciones de laboratorio. El rápido desarrollo larval, la alta adaptabilidad de los renacuajos a condiciones del laboratorio y el alto número de neonatos por nidada (aproximadamente, 300), posibilitan el empleo de renacuajos de esta especie en ensayos de toxicidad aguda y crónica (Gallo et al. 2006).

Se emplearon larvas de una sola nidada de *D. bogerti,* procedentes de una charca temporal en

la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, Medellín (Antioquia). La masa de huevos fue colectada al inicio del período de lluvias (mayo-junio) y fue trasportada en recipientes plásticos al laboratorio del grupo GAIA de la Universidad de Antioquia.

Los huevos fueron depositados en recipientes plásticos con agua proveniente de la charca, el agua fue reemplazada paulatinamente con agua potable filtrada, declorada y aireada hasta la eclosión. Los neonatos fueron aclimatados en acuarios de vidrio de 500 ml con agua reconstituida semidura durante cuatro días para ensayos de toxicidad aguda y siete días para ensayos crónicos. Durante la aclimatación y exposición de los renacuajos al $HgCl_2$, la temperatura varió entre 19 a 21 °C y el fotoperíodo fue 14:10 horas luz:oscuridad. Los promedios de las variables fisicoquímicas fueron 7,27 para el pH, 60 mg/l de $CaCO_3$ de dureza, 116 mg/l de alcalinidad y la concentración media de oxígeno disuelto fue 6,4 mg/l. La concentración de la solución *stock* empleada para los ensayos crónicos y agudos fue de 0,1 mg/l con el 98% de pureza y los renacuajos fueron alimentados con TetraMin *ad libitum.*

Renacuajos del estadio 26 de Gosner (1960) se expusieron a cinco concentraciones de $HgCl_2$ (0,25, 0,3, 0,36, 0,43 y 0,51 mg/l) y un control con agua de dilución durante 96 horas sin alimentación (Esclapés 1999, Reish y Oshida 1987). En cada tratamiento se emplearon cinco réplicas en 500 ml de solución y 30 renacuajos. El recambio de la solución y la cuantificación de ejemplares muertos se hizo cada 24 horas (Esclapés 1999).

A partir de los resultados de las pruebas de toxicidad aguda, se definieron las concentraciones de $HgCl_2$ (0,02, 0,04, 0,08 y 0,1 mg/l) y un control con agua de dilución para las pruebas crónicas. Para cada tratamiento, se emplearon 10 réplicas de dos larvas que se encontraban en estadio 26 (Gosner 1960).

Cada renacuajo se pesó a los 10, 20 y 30 días con una balanza electrónica ANAMER m- 300 de 0,001 g de precisión y se midió la longitud total con un calibrador electrónico de ± 0,1 mm de precisión. La solución se renovó cada 48 horas y después de cada recambio se suministró TetraMin *ad libitum.* Adicionalmente, se registró el tiempo en que cada renacuajo alcanzó el estadio 36 (Gosner 1960) o momento de emergencia de las extremidades posteriores. En la prueba de toxicidad crónica se siguieron los procedimientos establecidos por Rowe et al. (1996), Snodgrass et al. (2000), Sparling et al. (2006), Unrine y Jagoe (2004).

La Cl_{50} se determinó mediante el método Probit (Kalish 1990). Los resultados de toxicidad crónica, fueron evaluados previamente para determinar si cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, mediante las pruebas Shapiro-Wilk y de Bartlett, con $P > 0,001$ (Guisande et al. 2006). A los datos de peso transformados a $\sqrt{}$ y de longitud a X^2 se les aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un análisis de comparación múltiple de Dunnet. Posteriormente, se emplearon las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney, con el fin de establecer si existían diferencias significativas en la duración del desarrollo de los renacuajos. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SSPS.

RESULTADOS

Toxicidad aguda. En los neonatos tratados con $HgCl_2$ se observó inmovilidad temporal, tendencia a permanecer en el fondo del recipiente y contracciones musculares espasmódicas. La mortalidad de los renacuajos se incrementó con la concentración hasta alcanzar el 90% a 0,51 mg/l a las 96 h (figura 1). El valor de la CL_{50} durante 96 h fue 0,41 mg/l de $HgCl_2$.

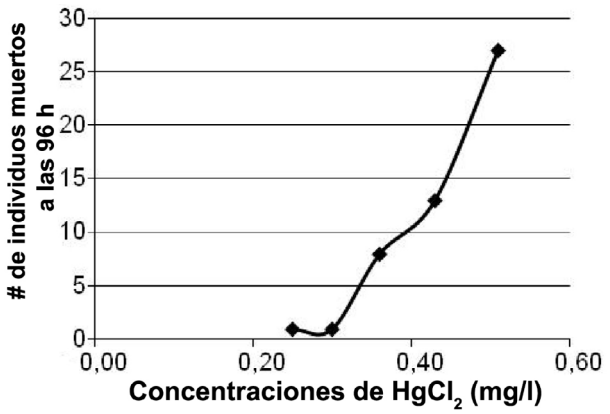

Figura 1. Mortalidad de larvas de *Dendrosophus bogerti* expuestas a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio **($HgCl_2$)** durante 96 h

Toxicidad crónica. Como se infiere de la tabla 1, la sobrevivencia de las larvas de *D. bogerti* disminuyó paulatinamente con el aumento de la concentración de $HgCl_2$ y alcanzó el 85% al final de los 30 días de exposición en la mayor concentración (0,1 mg/l $HgCl_2$).

Los valores de P de la prueba exacta de Fisher, superiores a 0,05, indican que no existen diferencias estadísticamente significativas en la sobrevivencia de renacuajos de *D. bogerti* tratados con $HgCl_2$ y los del control.

Tabla 1. Sobrevivencia de larvas de *D. bogerti* luego de 30 días de exposición a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio (**[$HgCl_2$]**)

[$HgCl_2$] (mg/l)	Ejemplares	Número	%
0,02	20	18	90
0,04	20	18	90
0,08	20	19	95
0,1	20	17	85
Control	20	20	100

En todos los tratamientos con $HgCl_2$ los renacuajos experimentaron reducción en el peso y en la talla promedio, respecto al control. Mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) se estableció que el peso de los renacuajos varió significativamente a los 10 ($F = 9,89$, $P < 0,001$), 20 ($F = 12,42$, $P < 0,001$) y 30 días ($F = 31,50$, $P < 0,001$) (figura 2). También el tamaño corporal de los renacuajos disminuyó significativamente con respecto a los ejemplares del control a los 10 ($F = 10,51$, $P = P < 0,001$), 20 ($F = 17,98$, $P < 0,001$) y 30 días de exposición ($F = 43,35$, $P < 0,001$) (figura 2).

De acuerdo con el análisis de Dunnet, a los 10 y 20 días de exposición el peso y la longitud de las larvas de *D. bogerti* expuestas a 0,02 mg/l $HgCl_2$ no se diferenciaron significativamente del control. En contraste, los ejemplares de los otros tratamientos mostraron diferencias significativas en el peso y la longitud con el control a los 10 y 20 días. Por su parte, a los 30 días el peso y la longitud de las larvas en todos los tratamientos con $HgCl_2$ presentaron diferencias significativas con el control (figura 2).

Tiempo de metamorfosis. Mientras el tiempo promedio de los renacuajos del control para alcanzar el estadio 36 de la metamorfosis fue 45,3 días (figura 3), la exposición de las larvas a $HgCl_2$ significó notable incremento de este período con promedio de 82,2 días en los ejemplares tratados con 0,1 mg/l $HgCl_2$. De acuerdo con los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, existen diferencias significativas entre los tratamientos en el tiempo necesario para alcanzar el estadio 36 ($H = 35,4$, $P < 0,001$).

La prueba de Mann-Whitney mostró que el tiempo para alcanzar el estadio 36 en las larvas expuestas a los cuatro tratamientos con $HgCl_2$ presentó diferencias significativas con el control ($P < 0,001$).

DISCUSIÓN

Este estudio es el primero en reportar a las larvas de *D. bogerti* como especie sensible al Hg ya

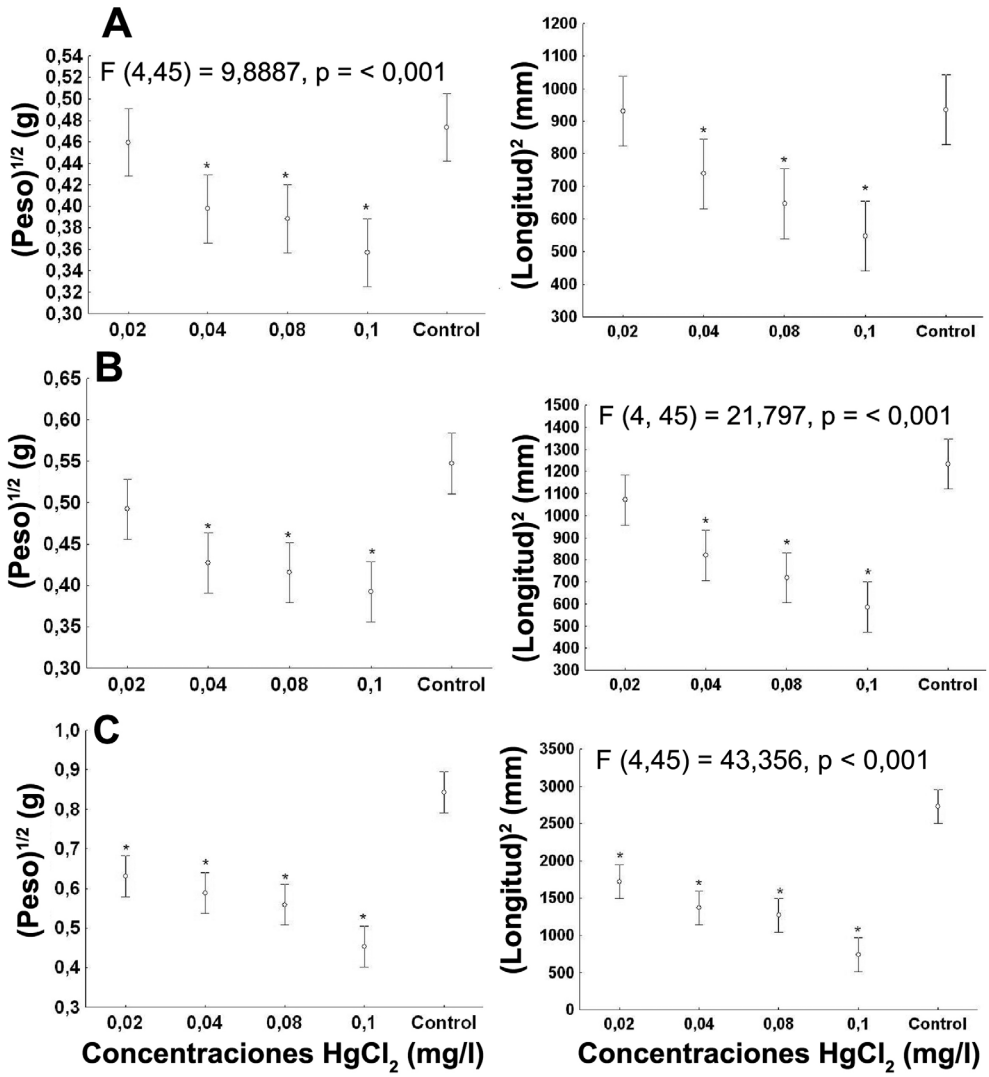

Figura 2. Peso medio (√) y longitud media (X^2) de larvas de *Dendrosophus bogerti* luego de 10 **(A)**, 20 **(B)** y 30 **(C)** días de exposición a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio ($HgCl_2$)

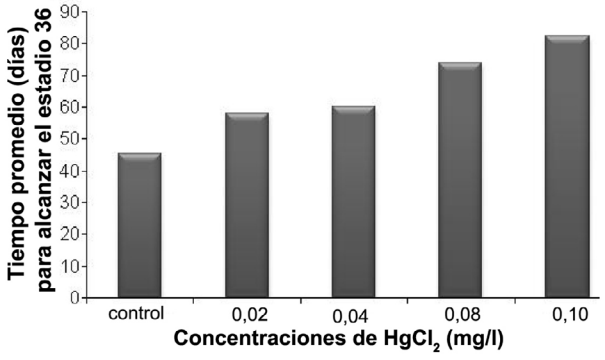

Figura 3. Tiempo promedio para alcanzar el estadio 36 de renacuajos de *D. bogerti* sometidos a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio ($HgCl_2$)

que demostraron efectos subletales, además, de ser de amplia distribución en el Valle de Aburrá y nativa para el departamento de Antioquia (Palacio et al. 2006), puede considerarse de mucha utilidad para evaluar la calidad del agua e integridad del ecosistema debido a la posición intermedia en las cadenas alimentarias. Por otro lado, *D. bogerti* se caracteriza por ser una rana que habita áreas perturbadas, hecho que nos permite inferir su contacto con contaminantes en sus hábitats naturales, su reproducción en

ambientes acuáticos temporales con numerosos huevos por puesta, entre otros, también, demostró una buena adaptabilidad de huevos y larvas a condiciones de laboratorio con un desarrollo larval relativamente corto. Por último, especies del género *Dendrosophus* han sido empleadas para evaluar los efectos de sustancias tóxicas (Albrecht et al. 2007, Brand et al. 2009, Britson y Threlkeld 1998).

El valor de la Cl_{50} de $HgCl_2$ en renacuajos de *D. bogerti* (0,41 mg/l) indica que son más tolerantes al Hg que los renacuajos de *Rana breviceps* (0,207 mg/l), *Rana pipens* (0,0073 mg/l) y *Bufo melanosticus* (0,056 mg/l) (TFG 2006) para el mismo período de exposición.

En embriones de la rana *Gastrophryne carolinensis* Birge y Black (1980) y Fort et al. (2006) reportaron diferentes Cl_{50} para el níquel, probablemente relacionadas con la variabilidad genética asociada al lugar de procedencia y al contacto de los renacuajos con el contaminante (Fort et al. 2006). Las posturas de *D. bogerti* fueron colectadas en la zona urbana de Medellín; probablemente la mayor tolerancia al Hg de esta especie esté relacionada por algún contacto de los adultos con el Hg en su ambiente natural.

La información sobre los efectos de xenobióticos en el crecimiento y tiempo de desarrollo de los renacuajos de anfibios tropicales es aún limitada. La mayoría de las investigaciones con el género *Dendrosophus (D. chrysoscelis, D. versicolor, D. cinerea)* han demostrado que los metales pesados son altamente tóxicos (Albrecht et al. 2007). Además, el mercurio reduce la longitud y la masa corporal de los renacuajos, incrementa el tiempo de desarrollo (Britson y Threlkeld 1998) y produce malformaciones (Brand et al. 2010).

La tasa de crecimiento de los renacuajos tratados con $HgCl_2$ se redujo considerablemente, en especial en la mayor concentración (0,1 mg/l). La reducción de peso y longitud de los renacuajos podría estar asociada con el incremento del costo metabólico debido a los procesos de depuración y detoxificación celular, a la reducción de la actividad de algunas enzimas (Valle y Ulmer 1972) y a la mayor demanda de síntesis de aminoácidos (Nishisaka 1994). De acuerdo con Rowe et al. (1998), las larvas de *Rana catesbeiana* que habitan en aguas contaminadas con metales pesados experimentaron pérdida de peso, asociado a altos costos metabólicos.

Peterson et al. (2008) encontraron una reducción en el número de dientes en los estadios 25 al 37 de larvas de *Rana sphenocephala* sometidas a una mezcla de metales pesados. Esta situación contribuyó a una disminución en el crecimiento, al igual que en renacuajos de *Rana catesbeiana* (Rowe et al. 1996). Probablemente, la reducida ganancia de peso está asociada a la inapetencia como se ha observado en la trucha *Oncorhynchus mykiss* expuesta a una concentración subletal de cadmio (Mcgeer et al. 1999).

Los juveniles de gran tamaño tendrán alta probabilidad de sobrevivir a la primera reproducción (Collins 1979, Smith 1987, Wilbur y Collins 1973) y mayor éxito reproductivo (Klump y Gerhardt 1987, Sparling et al. 2006, Sullivan 1992, Unrine et al. 2004). El macho de *D. bogerti* es más pequeño que la hembra y una reducción adicional del tamaño podría significar también disminución del éxito reproductivo. Adicionalmente, hembras pequeñas tienen posturas reducidas (Bush et al. 1996, Cummins 1986, Kaplan y Salthe 1979, Semlitsch 1987) como se ha evidenciado en *Rana sylvatica, Rana spenocephala* y *Pseudacris triseriata* expuestas a Hg y otros metales (Berven 1990, Peterson et al. 2008, Smith 1987).

Durante la metamorfosis los anfibios son muy sensibles a la exposición a sustancias químicas, debido a que experimentan cambios comportamentales, morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (Unrine et al. 2004). Aunque en

todos los tratamientos de $HgCl_2$ se evidenció retraso del desarrollo, en las mayores concentraciones, el efecto fue muy marcado y pudo estar relacionado con la interferencia de esta sustancia sobre la tiroides (Facemire et al. 1995) estrechamente relacionada con el proceso de la metamorfosis (Balls et al. 1985, Fort et al. 2000) como se ha demostrado en peces (Bhattacharya et al. 1989), roedores (Sin y Teh 1992) y humanos (McGregor y Mason 1991).

En renacuajos expuestos a soluciones acuosas de Hg^{2+}, Ray y Madhyastha (1987) observaron mayor sensibilidad durante los eventos importantes en el desarrollo de la metamorfosis. De acuerdo con Unrine et al. (2004), la acumulación del Hg en el tejido de la cola de los renacuajos bloquea los puentes disulfuros de las proteínas y retrasa el tiempo de absorción en *R. sphenocephala.* Es posible que el retraso de la emergencia de las patas posteriores en *D. bogerti* esté relacionado con esta situación.

El retraso en la tasa de desarrollo afecta la sobrevivencia de las larvas de anuros y especialmente de las especies que cumplen sus estadios tempranos en aguas temporales como *D. bogerti.* Los renacuajos que experimentan metamorfosis tardías no sobrevivirán, debido a la desecación (Denver 1997, Sparling et al. 2006). Asimismo, los individuos con extensos períodos larvales son altamente vulnerables a depredadores (Babbitt y Tanner 1997, Lefcort et al. 1998, Semlitsch y Gibbons 1988, Werner 1991).

Las larvas de *D. bogerti* expuestas al Hg demostraron efectos subletales, su posición intermedia en las cadenas alimentarias, la producción de numerosos huevos por camada, la buena adaptabilidad de huevos y larvas a condiciones de laboratorio y un desarrollo larval relativamente corto indican que esta rana podría considerarse para estudios ecotoxicológicos.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que una exposición crónica de renacuajos a concentraciones superiores a 0,02 mg/l $HgCL_2$ tiene efectos significativamente desfavorables sobre el crecimiento y la tasa de desarrollo con posibles consecuencias sobre el *fitness* de los organismos. Aunque los resultados de la concentración letal media de mercurio para *D. bogerti* indican menor sensibilidad con relación a otras especies de anfibios reportadas en la literatura, es vulnerable a la acción de contaminantes que son usados sin control en la minería e industrias.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental **(GAIA)** por su apoyo económico, igualmente a sus integrantes por su colaboración en este estudio.

REFERENCIAS

Albrecht J, Abalos M, Rice TM. 2007. Heavy metal levels in ribbon snakes *(Thamnophis sauritus)* and anuran larvae from the Mobil-Tensaw river Delta, Alabama, U. S. A. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 53 (4): 647-654.

Babbitt KJ, Tanner GW. 1997 Effects of cover and predator identity on predation of *Hyla squirella* tadpoles. Journal of Herpetology, 31 (1): 128-130.

Balls M, Clothier RH, Rowles JM, Kiteliey NA, Bennett GW. 1985. TRH distribution, levels and significance during the development of *Xenopus laevis*. En: Balls M, Bounes M, editores. Metamorphosis 8th Symposium British Society Developmental Biology. Oxford: Clarendon Press. p. 260-271.

Berven KA. 1990. Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*). Ecology, 71 (4): 1599-1608.

Bhattacharya T, Bhattacharya S, Ray AK, Dey S. 1989. Influence of industrial pollutants on thyroid function in *Channa punctatus* (Bloch). Indian Journal of Experimental Biology, 27 (1): 65-68.

Birge WJ, Black JA. 1980. Aquatic toxicology of nickel. En: Nriagu Jo editor. Nickel in the Environment. New York: J. Wiley and Sons. p. 349-366.

Brand AB, Snodgrass JW, Gallagher MT, Casey RE, Meter RV. 2010. Lethal and sublethal effects of embryonic and larval exposure of *Hyla versicolor* to stormwater pond sediments. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 58 (2): 325-331.

Bridges CC, Zalups Rk. 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. Toxicology and Applied Pharmacology, 204 (3): 274-308.

Britson CA, Threlkeld ST. 1998. Abundance, metamorphosis, developmental and behavioral abnormalities in *Hyla chrysoscelis* tadpoles following exposure to three agrichemicals and methyl mercury in outdoor mesocosms. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 61 (2): 154-161.

Bulog B, Mihajl K, Zvonka J, Mihael JT. 2002. Trace element concentrations in the tissues of *proteus anguinus* (Amphibia, Caudata) and the surrounding environment. Water, Air, and Soil Pollution, 136 (1-4): 147-163.

Burger J, Snodgrass, J. 2001. Metal levels in southern leopard frogs from the Savannah river site: location and body compartment effects. Environmental Research (Section A), 86 (2): 157-166.

Bush SL, Dyson ML, Halliday TR. 1996. Selective phonotaxis by males in the Majorcan Midwife toad. Proceedings of Biological Sciences, 263 (1372): 913-917.

Christin MS, Me´nard L, Gendron AD, Ruby S, Cyr D, Marcogliese DJ, Rollins-Smith L, Fournier M. 2004. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. Aquatic Toxicology, 67 (1): 33-43.

Collins JP, Storfer A. 2003. Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. Diversity and Distribution, 9: 89-98.

Collins JP. 1979. Intrapopulation variation in the body size at metamorphosis and timing of metamorphosis in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Ecology, 60 (4): 738-749.

Cummins CP. 1986. Temporal and spatial variation in egg size and fecundity in *Rana temporaria*. Journal of Animal Ecology, 55 (1): 303-316.

Denver RJ. 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. American Zoologist, 37 (2): 172-184.

Esclapés M. 1999. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0. Caracas (Venezuela): PDVSA. INTEVEP. p. 215.

Facemire CF, Gross TS, Guillette LJ. Jr. 1995. Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nuture? Environmental Health Perspectives, 103 (4): 79-86.

Fort DJ, Rogers RL, Morgan LA, Miller MF, Clark PA, White JA, Paul RR, Stover EL. 2000. Preliminary validation of a short term morphological assay to evaluate adverse effects on amphibian metamorphosis and thyroid function using *Xenopus laevis*. Journal of Applied Toxicology, 20 (5): 419-425.

Fort DJ, Rogers RL, Thomas JH, Hopkins WA, Schleka C. 2006. Comparative developmental toxicity of nickel to *Gastrophryne carolinensis, Bufo terrestris,* and *Xenopus laevis*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51: 703-710.

Gallo-D SM, Palacio J, Gutiérrez-C PD. 2006. Efectos del insecticida clorpirifos sobre la tasa de crecimiento y la metamorfosis de *Smilisca phaeota* (Cope, 1862) (Anura: Hylidae). Actualidades Biológicas, 28 (84): 51-58.

Gosner K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, 16 (3): 183-190.

Guisande C, Barreiro A, Maneiro I, Riveiro I, Vergara R, Vaamonde A. 2006. Tratamiento de datos. Madrid (España): Editorial Díaz de Santos. p. 355.

Hayes N, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A. 2002. Herbicides: Feminization of male frogs in the wild. Nature, 419: 895-896.

Kalish LA. 1990. Efficient desing for stimation of median lethal dose and quantal dose-response curves. Biometric, 46 (3): 737-748.

Kaplan RH, Salthe SN. 1979. The allometry of reproduction: an empirical view in salamanders. American Naturalist, 113 (5): 671-689.

Klump GM, Gerhardt HC. 1987. Use of non arbitrary acoustic criteria in mate choice by female Gray Tree frogs. Nature, 326: 286-288.

Lefcort H, Meguire RA, Wilson LH, Ettinger WF. 1998. Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 35 (3): 447-456.

Loumbourdis N, Danscher G. 2008. Autometallographic tracing of Hg-S quantum dots in foros exponed to inorganic mercury. Biometals, 21: 311-319.

Malm O, Pfeiffer W, Souza C, Reuther R. 1990. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira River. Journal of the Human Environment, 19: 1-8.

Marrugo-Negrete JL, Lans E. 2006. Impacto ambiental por contaminación con níquel, mercurio y cadmio en aguas, peces y sedimentos en la cuenca del río San Jorge, en el departamento de Córdoba. Montería (Córdoba): Centro de Investigaciones (CIUC), Universidad de Córdoba.

Marrugo-Negrete J, Benítez LN, Olivero-Verbel J. 2008. Distribution of mercury in several environmental compartments in an aquatic ecosystem impacted by gold mining in Northern Colombia. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 55 (2): 305-316.

Mcgeer JC, Szebedinsky C, McDonald DG, Wood CMd. 1999. Effects of chronic sublethal exposure to waterbone Cu, Cd, or Zn, in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. Aquatic Toxicology, 50 (3): 231-243.

McGregor AJ, Mason HJ. 1991. Occupational mercury vapour exposure and testicular, pituitary, and thyroid endocrine function. Human and Experimental Toxicology, 10 (3): 199-203.

Nishisaka N. 1994. Sensitivity of of inmature regenerating proximal tubular cell in Rabbit kidney to mercuric-chloride a light and electron microscopic analysis. Nippon Jinzo Gakkasi Shi, 36 (4): 298-306.

Palacio J, Muñoz E, Gallo S, Rivera M. 2006. Anfibios y reptiles del Valle de Aburrá. Medellín (Colombia): Editorial Zuluaga p. 174.

Palacio J, Aguirre N, Barrera J. 2002. Efectos tóxicos de la exposición aguda de *Prochilodus magdalenae* a cloruro de mercurio. Actualidades Biológicas, 24 (77): 123-128.

Peterson JD, Peterson VA, Mendonca MT. 2008. Growth and Developmental Effects of Coal Combustion Residues on Southern Leopard Frog (*Rana sphenocephala*) Tadpoles Exposed throughout Metamorphosis. Copeia, 2008 (3): 499-503.

Ray J, Madhyastha MN. 1987. Toxicities of some heavy metals to the tadpoles of frog, *Microhyla ornata* (Dumeril y Bibron). Toxicology Letters, 36 (2): 205-208.

Reish D, Oshida P. 1987. Manual of methods in aquatic environment research. Part 10 - Short-term static bioassays. Roma (Italia): FAO. p. 62.

Rouhani Rankouhi T, Sanderson JT, Van Holsteijn I, Van Kooten P, Bosveld ATC, Van den Berg M. 2005. Effects of environmental and natural estrogens on vitellogenin production in hepatocytes of the brown frog *(Rana temporaria)*. Aquatic Toxicology, 71 (1): 97-101.

Rowe CL, Kinney OM, Nagle RD, Congdon JD. 1998. Elevated maintenance cost in anuran *(Rana catesbeiana)* exposed to a mixture of trace elements during the embryonic and early larval periods. Physiological and Biochemical Zoolology, 71 (1): 27-35.

Rowe CL, Kinney OM, Fiori AP, Congdon JD. 1996. Oral deformities in tadpoles *(Rana catesbeiana)* associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. Freshwater Biology, 36 (3): 723-730.

Semlitsch RD, Gibbons JW. 1988. Fish predation in size-structured populations of treefrog tadpoles. Oecologia, 81 (3): 100-103.

Semlitsch RD. 1987. Relationship of pond drying to the reproductive success of the salamander *Ambystoma talpoideum*. Copeia, 61 (1): 61-69.

Sin YM, Teh CI. 1992. Effect of long-term uptake of mercuric sulphide on thyroid hormones and glutathione in mice. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 49 (3): 847-854.

Smith D. 1987 Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. Ecology, 68 (2): 344-350.

Snodgrass JW, Jagoe CH, Bryan AL, Brant HA, Burger J. 2000. Effects of trophic status and wetland morphology, hydroperiod and water chemistry on mercury concentration in fish. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 57 (1): 171-180.

Sparling DW, Krest S, Ortiz-Santaliestra, M. 2006. Effects of Lead-Contaminated Sediment on *Rana sphenocephala* tadpoles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51 (3): 458-466.

Sullivan BK. 1992. Sexual selection and calling behavior in the American toad *(Bufo americanus)*. Copeia, 1992 (1): 1-7.

TFG (Taylor y Francis Group). 2006. Lethal and sublethal effects of mercury under controlled conditions. CRCnetBASE. Fecha de acceso: 07 de enero de 2010. Disponible en: <http://www.environetbase.com/books/4576/9212ch8.pdf>.

Unrine JM, Hopkins WA, Romanek CS, Jackson, BP. 2007. Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: Implications for amphibian health and contaminant transport. Environmental Pollution, 149 (2): 182-192.

Unrine JM, Jagoe C, Hopkins WA, Brant HA. 2004. Aderse effects of ecologically relevant dietary mercury exposure in southern leopard frog *(Rana sphenocephala)* larvae. Environmental Toxicology and Chemistry, 23 (12): 2964-2970.

Unrine JM, Jagoe C. 2004. Dietary mercury exposure and bioaccumulation in southern leopard frog *(Rana sphenocephala)* larvae. Environmental Toxicology and Chemistry, 23 (12): 2956-2963.

Unrine JM, Jagoe C. Brinton HA, Brant NT. 2005. Dietary mercury exposure and bioaccumulation in amphibian larvae inhabiting Carolina bay Wetlands. Environmental Pollution, 135 (2): 245-253.

Valle BL, Ulmer DD. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Annual Review of Biochemistry, 41: 91-128.

Werner EE. 1991. Nonlethal effects of a predator on competitive interactions between two anuran larvae. Ecology, 72 (5): 1709-1720.

Wilbur HM, Collins JP. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis: nonnormal distributions of competitive ability reflect selection for facultative metamorphosis. Sciences, 182 (4119): 1305-1314.