



“Estudios ecotoxicológicos sobre anfibios anuros asociados a cuerpos de agua bajo distintos tipos de manejo agrícola en agroecosistemas del sureste de la provincia de Córdoba”

Lic. Zulma A. Salinas

Directora: Dra. Nancy E. Salas
Co-Director: Dr. Rafael Lajmanovich



Marzo 2019





UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES
Orientación Ecología

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**ESTUDIOS ECOTOXICOLÓGICOS SOBRE ANFIBIOS ANUROS
ASOCIADOS A CUERPOS DE AGUA BAJO DISTINTOS TIPOS DE
MANEJO AGRÍCOLA EN AGROECOSISTEMAS DEL SURESTE DE LA
PROVINCIA DE CÓRDOBA**

Lic. Zulma Anahí SALINAS

DIRECTOR: Dra. Nancy Edith SALAS

CODIRECTOR: Dr. Rafael Carlos LAJMANOVICH

Río Cuarto, Marzo de 2019

COMISION ASESORA Y JURADO

Dr. José Camilo BEDANO Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba,
Argentina.

Firma

Aclaración

Dr Arturo Ignacio KEHR Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias
Exactas, Naturales y Agrimensura. Corrientes,
Argentina.

Firma

Aclaración

Dr. Jorge Waldemar PRIOTTO Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba,
Argentina.

Firma

Aclaración

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha: Universidad Nacional de Río Cuarto, 28 de Marzo de 2019

Calificación.....

"Habrá que dejar el pesimismo para tiempos mejores. Hoy más que nunca es preciso soñar. La realidad no es un destino, es un desafío que nos invita a resistir, a revelarnos, a imaginarnos el futuro en vez de vivirlo como una penitencia inevitable. Mucha gente pequeña en lugares pequeños haciendo cosas pequeñas pueden cambiar el mundo. Ojalá podamos ser desobedientes"

-Eduardo Galeano

AGRADECIMIENTOS

- . Agradezco encarecidamente a CONICET y a la Universidad Nacional de Río Cuarto por brindarme el espacio y la posibilidad de realizar este proyecto de investigación.
- . A mis directores Dra. Nancy E. Salas y Dr. Rafael C. Lajmanovich por la paciencia y dedicación en cada uno de los pasos que forman parte de este camino.
- . Al jurado Dr. José C. Bedano, Dr. José W. Priotto y Dr. Arturo Kehr por haberme aportado conocimientos y aconsejado, no solo en cada instancia sino personalmente acerca de cómo proceder en cada paso.
- . A los integrantes de Ecología (ECOEA) Adolfo Martino, Nancy Salas, Clarisa Bionda, Pablo Grenat, Mariana Baraquet, Selene Babini, Favio Pollo, Manuel Otero, Celeste Salinero, Eluney Frutos, Martín Pérez y a todos los que integran ese hermoso grupo de personas que siempre me han acompañado y apoyado tanto en las malas como en las buenas sin pedir nada a cambio.
- . Al Departamento de Ciencias Naturales y a todos mis compañeros biólogos por el aliento a seguir adelante.
- . A Carlos Sosa por acompañarme en cada uno de los muestreos, Marcela Moressi con su paciencia en explicarme cómo funcionan distintas metodologías para medir plaguicidas, y a Osvaldo Campanella para generar los mapas y cursar la materia ITAE para ampliar mi conocimiento y aportar más a mi doctorado.
- . A mis amigos del Conservatorio de Música Julián Aguirre y a todos aquellos que me han alentado en todo momento sin dudarlo.
- . A mis familiares que con todo el amor del mundo confiaron en mí en todos los proyectos que emprendí y emprendo en la vida. En especial a mis padres y hermana que tanto amo.
- . A Marcelo por acompañarme en cada momento y situación que formaron parte de este camino.

Recursos financieros para la realización de la tesis

A continuación se menciona una lista de los recursos financieros que permitieron la realización de este trabajo:

- 1) Beca Interna Doctoral Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- 2) Programa 18/C288, Programa 18/C350, Programa 18/C416 y Programa 18/C448: Evaluación y actualización de la diversidad de anfibios en el área central de Argentina, su conservación, manejo y transferencia educativa. Director: Dr. A. Martino Financiado por Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Resolución Rectoral n° 807/09; 852/11 y 161/16.
- 3) FONCyT-PICT (2012). Categoría: Temas Abiertos. Tipo de proyecto: Equipo de Trabajo. Tema: “Evaluación y actualización de la diversidad de anfibios del área central de Argentina, su diversidad, conservación e importancia práctica en salud humana”. Responsable: Dr. Adolfo L. Martino. Código: 2014-2613.
- 4) FONCyT-PICT (2014-2017). Categoría: Temas Abiertos. Tipo B: Investigador joven. Tema: “Anfibios anuros de los agroecosistemas y sistemas naturales de la provincia de Córdoba: historias de vida, ecotoxicología e implicancias demográficas para su manejo y conservación”. Responsable: Dra. Clarisa L. Bionda. Código: 2014-2533.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Páginas
1	Clasificación esperada de las lagunas estudiadas en función de los tipos de manejos a los que se encuentran asociadas.	20
2	VARIABLES ambientales asociadas a la perturbación que reciben los cuerpos de agua en estudio.	25-26
3	Juicio de indicadores de impacto o perturbaciones.	27
4a	VARIABLES registradas en primavera-verano	28
4 b	Ponderación de las variables en función a la perturbación para cada uno de los sitios correspondiente a primavera (<i>Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM= Laguna Vaca Muerta, LagG= Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL= Laguna Brazo Largo, LagY= Laguna Yuyal; Color amarillo=perturbación a nivel de cobertura; Color verde=perturbación a nivel de agricultura; Color celeste=perturbación a nivel de disturbios; Color violeta=perturbación a nivel de conectividad; Color turquesa= perturbación a nivel de hidriperiodo</i>)).	38-39
5	Ponderación de las variables en función a la perturbación para cada uno de los sitios correspondiente a verano (<i>Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM= Laguna Vaca Muerta, LagG= Laguna Gigante, LagC= Laguna Canaleta, LagBL= Laguna Brazo Largo, LagY= Laguna Yuyal; Color amarillo=perturbación a nivel de cobertura; Color verde=perturbación a nivel de agricultura; Color celeste=perturbación a nivel de disturbios; Color violeta=perturbación a nivel de conectividad; Color turquesa= perturbación a nivel de hidriperiodo</i>)).	39-40
6	VARIABLES ambientales de los sitios estudiados en primavera (<i>Referencias: Temp.=Temperatura, SDT=Sólidos disueltos totales, Sal=Salinidad, Cond=Conductividad, Ox= Oxígeno, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal</i>).	48
7	VARIABLES ambientales de los sitios estudiados en verano (<i>Referencias: Temp.=Temperatura, SDT=Sólidos disueltos totales, Sal=Salinidad, Cond=Conductividad, Ox= Oxígeno, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal</i>).	50
8	VARIABLES físico-químicas para la estación de primavera (P) (<i>Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal</i>).	52
9	VARIABLES físico-químicas para la estación de verano (V) (<i>Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y</i>	54

- LagY=Laguna Yuyal).*
- 10 Clasificación del agua de los sitios muestreados (*Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).* 55
 - 11 Pesos de las variables ambientales y físicoquímicas sobre los componentes PC1 y PC2 (*Referencias: CO₃:Carbonato; HCO₃:Bicarbonatos; SO₄: Sulfatos; Cl-: Cloruros; Na⁺: ión sodio; K⁺: ión potasio; Ca⁺⁺: ión calcio; Mg⁺⁺: ión magnesio; NO₃-: Nitrato; NO₂-: Nitrito; F-: Flúor; As^{+3/+5}: Arsénico; PO₄³⁻: Fosfatos; SDT: Sólidos Disueltos Totales; Sal: Salinidad; Cond: Conductividad; Ox: Oxígeno Turv: Turbidez).* 57
 - 12 Pesos de las variables ambientales y físicoquímicas sobre los componentes PC1 y PC2 (*Referencias: CO₃: Carbonato; HCO₃: Bicarbonatos; SO₄: Sulfatos; Cl-: Cloruros; Na⁺: ión sodio; K⁺: ión potasio; Ca⁺⁺: ión calcio; Mg⁺⁺: ión magnesio; NO₃-: Nitrato; NO₂-: Nitrito; F-: Flúor; As^{+3/+5}: Arsénico; PO₄³⁻: Fosfatos; SDT: Sólidos Disueltos Totales; Sal: Salinidad; Cond: Conductividad; Ox: Oxígeno; Turv: Turbidez).* 59
 - 13 Tamaño muestral de individuos utilizados como bioindicadores correspondiente a la especie *R. arenarum*. 59
 - 14 Tamaño muestral de individuos utilizados como bioindicadores correspondiente a la especie *L. latrans*. 60
 - 15 Micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de individuos de *R. arenarum* (*Referencias: n= número de individuos, Mn= Micronúcleos, ANE= Anormalidades Nucleares Eritrocitarias, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo).* 60
 - 16 Biomarcadores citotóxicos en eritrocitos de individuos de *R. arenarum* (*Referencias: n= número de individuos, p/p= puente plasmático, EI= Eritrocitos inmaduros, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo).* 62
 - 17 Micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de individuos de *L. latrans*. (*Referencias: n= número de individuos, Mn= Micronúcleos, ANE= Anormalidades Nucleares Eritrocitarias, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).* 65
 - 18 Biomarcadores hematológicos en eritrocitos de individuos de *L. latrans* (*Referencias: n= número de individuos, p/p= puente plasmático, EI= Eritrocitos inmaduros, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).* 66

19	Fórmula leucocitaria para los individuos de <i>R. arenarum</i> (Referencias: <i>n</i> =número de individuos, <i>LM</i> = Linfocitos maduros, <i>LI</i> = Linfocitos inmaduros, <i>N1</i> = Neutrófilo unilobular, <i>N2</i> = Neutrófilo bilobular, <i>N3</i> = Neutrófilo trilobular, <i>E</i> = Eosinófilos, <i>B</i> = Basófilos, <i>M</i> = Monocitos, <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo).	70
20	Fórmula leucocitaria para los individuos de <i>L. latrans</i> (Referencias: <i>n</i> =número de individuos, <i>LM</i> = Linfocitos maduros, <i>LI</i> = Linfocitos inmaduros, <i>N1</i> = Neutrófilo unilobular, <i>N2</i> = Neutrófilo bilobular, <i>N3</i> = Neutrófilo trilobular, <i>E</i> = Eosinófilos, <i>B</i> = Basófilos, <i>M</i> = Monocitos, <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo y <i>LagY</i> =Laguna Yuyal).	74
21	Medidas de Peso, LHC (Longitud Hocico Cloaca) y CC (Condición Corporal) de los individuos de <i>R. arenarum</i> (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo largo).	81
22	Medidas de Peso, LHC (Longitud Hocico Cloaca) y CC (Condición Corporal) de los individuos de <i>L. latrans</i> (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo largo).	83
23	Registros de inmovilidad y/o movimientos anormales durante el desarrollo del experimento AMPHITOX (Referencias: 1. Inmovilidad. 2. Nado hacia arriba 3. Nado en círculos. 4. Panza hinchada, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo, <i>LagY</i> =Laguna Yuyal, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>C</i> =Control).	89
24	Media de los pH registrados durante el experimento AMPHITOX (Referencias: <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo, <i>LagY</i> =Laguna Yuyal, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagS</i> =Laguna Sur).	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Área de estudio seleccionada (<i>Referencias: AV=Estancia Altos Verdes, LG=Estancia Las Gaviotas, 2H=Estancia Las Dos Hermanas</i>).	18
2	Lagunas de muestreo. a) Laguna Vaca Muerta (LagVM), b) Laguna Sur (LagS), c) Laguna Gigante (LagG), d) Laguna Canaleta (LagC), e) Laguna Brazo Largo (LagBL), f) Laguna Yuyal (LagY).	19
3	Macho y hembra adultos de <i>Rhinella arenarum</i> . Foto de Clarisa Bionda.	21
4	Juvenil de <i>Leptodactylus latrans</i> . Foto: Zulma Salinas.	22
5	Micronúcleos (Mn) y Anormalidades Nucleares Eritrocitarias (ANE). a) Micronúcleo, b) Eritrocito con núcleo globular, c) Eritrocito con núcleo brotado, d) Eritrocito con núcleo escotado, e) Eritrocito con núcleo binucleado. Fotos: Zulma Salinas	32
6	Eritrocito amitótico a-b), Célula en división c), Eritrocito inmaduro d), Eritrocito anucleado e). Fotos: Zulma Salinas	33
7	Esquema de Estancia Altos verdes (<i>Referencias: CONV=Convencional, VEC=Vecino, ORG=Orgánico, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca muerta, PRIM=Primavera, VER=Verano</i>).	42
8	Esquema de Estancia Las Gaviotas (<i>Referencias: CONV=Convencional, ORG=Orgánico, LagC=Laguna Canaleta, LagG=Laguna Gigante, PRIM=Primavera, VER=Verano</i>).	43
9	Esquema de Estancia Las Dos Hermanas (<i>Referencias: ORG=Orgánico, NAT=Natural, LagBL=Laguna Brazo largo, LagY=Laguna Yuyal, P=Primavera, V=Verano, ENT=Entrada, CAS=Casco</i>).	44
10	Lluvia caída en cada mes expresada en milímetros en cada una de las estancias. a) Estancia Altos verdes. b) Estancias Las Gaviotas. c) Estancia Las Dos Hermanas.	45-46
11	Gráfico de análisis de componentes principales para la estación de primavera (<i>Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal, CO₃: Carbonato; HCO₃: Bicarbonatos; SO₄: Sulfatos; Cl⁻: Cloruros; Na⁺: ión sodio; K⁺: ión potasio; Ca⁺⁺: ión calcio; Mg⁺⁺: ión magnesio; NO₃⁻: Nitrito; NO₂⁻: Nitrito; F⁻: Flúor; As^{+3/+5}: Arsénico; PO₄³⁻: Fosfatos; SDT: Sólidos Disueltos Totales; Sal: Salinidad; Ox: Oxígeno; Turv: Turbidez</i>).	56
12	Gráfico de análisis de componentes principales para la estación de verano (<i>Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal, CO₃:Carbonato; HCO₃:Bicarbonatos;</i>	58

SO_4^- : Sulfatos; Cl^- : Cloruros; Na^+ : ión sodio; K^+ : ión potasio; Ca^{++} : ión calcio; Mg^{++} : ión magnesio; NO_3^- : Nitrato; NO_2^- : Nitrito; F^- : Flúor; $As^{+3/+5}$: Arsénico; PO_4^{3-} : Fosfatos; *SDT*: Sólidos Disueltos Totales; *Sal*: Salinidad; *Ox*: Oxígeno; *Turv*: Turbidez).

- | | | |
|----|---|----|
| 13 | Frecuencias de biomarcadores genéticos y sus desvíos para <i>R. arenarum</i> (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo). | 61 |
| 14 | Anormalidades Genéticas Totales de la especie <i>R. arenarum</i> (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo; <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente ($p > 0.05$). | 62 |
| 15 | Biomarcadores citotóxicos y sus desvíos para la especie <i>R. arenarum</i> (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo). | 63 |
| 16 | Frecuencia de eritrocitos inmaduros y sus desvíos de <i>R. arenarum</i> (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo). | 63 |
| 17 | Anormalidades Citotóxicas Totales (AGT) de la especie <i>R. arenarum</i> para cada sitio. (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente ($p > 0.05$). | 64 |
| 18 | Figura 18. Frecuencias de biomarcadores genéticos y sus desvíos para la especie <i>L. latrans</i> (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo y <i>LagY</i> =Laguna Yuyal). | 65 |
| 19 | Anormalidades Genéticas Totales (AGT) de la especie <i>L. latrans</i> para cada sitio (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo y <i>LagY</i> =Laguna Yuyal). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente ($p > 0.05$). | 66 |
| 20 | Frecuencias de los biomarcadores citotóxicos y sus desvíos para los individuos de la especie <i>L. latrans</i> . (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo y <i>LagY</i> =Laguna Yuyal). | 67 |
| 21 | Frecuencia de eritrocitos inmaduros y sus desvíos para la especie <i>L. latrans</i> (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo y <i>LagY</i> =Laguna Yuyal). | 67 |
| 22 | Anormalidades Citotóxicas Totales (ACT) para la especie <i>L. latrans</i> (Referencias: <i>LagS</i> =Laguna Sur, <i>LagVM</i> =Laguna Vaca Muerta, <i>LagG</i> =Laguna Gigante, <i>LagC</i> =Laguna Canaleta, <i>LagBL</i> =Laguna Brazo Largo y <i>LagY</i> =Laguna Yuyal). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente ($p > 0.05$). | 68 |

- 23 Fórmula leucocitaria y sus desvíos para la especie *R. arenarum* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo, Linfo M=Linfocitos maduros, Linfo I=Linfocitos inmaduros, N1=Neutrófilos unilobulados, N2=Neutrófilos bilobulados, N3=Neutrófilos trilobados, Eo=Eosinófilos, Baso=Basófilos, Mono=Monocitos). 70
- 24 Gráficos del modelo lineal generalizado para la fórmula leucocitaria de *R. arenarum* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo, Linfo M=Linfocitos maduros, Linfo I=Linfocitos inmaduros, N1=Neutrófilos unilobulados, N2=Neutrófilos bilobulados, N3=Neutrófilos trilobados, Eo=Eosinófilos, Baso=Basófilos, Mono=Monocitos). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son estadísticamente diferente ($p > 0.05$). 72
- 25 Fórmula leucocitaria y sus desvíos para *L. latrans* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal, Linfo M=Linfocitos maduros, Linfo I=Linfocitos inmaduros, N1=Neutrófilos unilobulados, N2=Neutrófilos bilobulados, N3=Neutrófilos trilobulados, Eo=Eosinófilos, Baso=Basófilos, Mono=Monocitos). 74
- 26 Gráficos del modelo lineal generalizado para la fórmula leucocitaria de *L. latrans* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo, LagY=Laguna Yuyal, Linfo M=Linfocitos maduros, Linfo I=Linfocitos inmaduros, N1=Neutrófilos unilobulados, N2=Neutrófilos bilobulados, N3=Neutrófilos trilobados, Eo=Eosinófilos, Baso=Basófilos, Mono=Monocitos). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son estadísticamente diferente ($p > 0.05$). 75-76
- 27 Gráfico triplot de correspondencia canónica para la especie *R. arenarum*. Los puntos azules representan las lagunas, mientras que los triángulos, los parámetros biológicos. Las flechas rojas, las variables ambientales.(Referencias: S: Laguna Sur, VM: Laguna Vaca Muerta, G: Laguna Gigante, C: Laguna Canaleta, BL: Brazo Largo, Mn: Micronúcleos, ANE: Anormalidades Nucleares Eritrocitarias, ACT: Anormalidades Citotóxicas Totales, EI: Eritrocitos Inmaduros, L: Linfocitos, N: Neutrófilos, E: Eosinófilos, B: Basófilos, M: Monocitos, HCO₃: Bicarbonatos; SO₄⁻: Sulfatos; Cl⁻: Cloruros; Na⁺: ión sodio; K⁺: ión potasio; Mg⁺⁺: ión magnesio; NO₃⁻: Nitrato; F: Flúor; As^{+3/+5}: Arsénico; PO₄³⁻: Fosfatos; SDT: Sólidos Disueltos Totales; Sal: Salinidad; Ox: Oxígeno; Distancia al cultivo, Turv: Turbidez). 77
- 28 Gráfico triplot de correspondencia canónica para la especie *L. latrans*. Los puntos azules representan las lagunas, mientras que los triángulos, los parámetros biológicos. Las flechas rojas, las variables ambientales (Referencias: S: Laguna Sur, VM: Laguna Vaca Muerta, G: Laguna Gigante, C: Laguna Canaleta, BL: Brazo Largo, Y: Laguna Yuyal, Mn: Micronúcleos, ANE: Anormalidades Nucleares Eritrocitarias, ACT: Anormalidades Citotóxicas Totales, EI: Eritrocitos Inmaduros, L: Linfocitos, N: Neutrófilos, E: Eosinófilos, B: Basófilos, M: Monocitos, 79

HCO₃: Bicarbonatos; *SO₄⁻*: Sulfatos; *Cl⁻*: Cloruros; *Na⁺*: ión sodio; *K⁺*: ión potasio; *Mg⁺⁺*: ión magnesio; *NO₃⁻*: Nitrato; *F⁻*: Flúor; *As^{+3/+5}*: Arsénico; *PO₄³⁻*: Fosfatos; *SDT*: Sólidos Disueltos Totales; *Sal*: Salinidad; *Ox*: Oxígeno; *Distancia al cultivo*, *T*: Turbidez).

29	Larvas de <i>L. latrans</i> con malformaciones. a) Larva con pico córneo pero sin queratodontes (0/0) en estadio 27 de Gosner, b) Larva sin la base del pico córneo en estadio 27 de Gosner, c) Larva con abdomen rojizo o edema en estadio 28 de Gosner, d) Larva con abdomen hinchado en estadio 40 de Gosner.	84
30	a) Hembra sin la extremidad superior izquierda (10% de esta malformación), y b) Hembra con Ectromelia en extremidad superior derecha (10% de ectromelia).	85
31	a) Macho de <i>R. arenarum</i> con Polidactilia y b) Hembra de <i>L. latrans</i> con fusión de dedos.	86
32	a) Comienzo del experimento de ANPHITOX. b) Acondicionamiento de cordones para luego seleccionar las larvas que se encontraban en el estadio de interés para el experimento.	87
33	Aplicación de alimento dado su movilidad. a) Estante con varias concentraciones. b) Vista más cercana de larvas en movimiento.	88
34	Gráfico de barras para los porcentajes de las distintas inmovilidades y/o movimientos anormales registradas durante el experimento (Día 13/11/2017) (Referencias: <i>LagBL=Laguna Brazo Largo</i> , <i>LagY=Laguna Yuyal</i> , <i>LagC=Laguna Canaleta</i> , <i>LagG=Laguna Gigante</i> , <i>LagVM=Laguna Vaca Muerta</i> , <i>LagS=Laguna Sur</i>).	90
35	Gráfico de barras para los porcentajes de las distintas inmovilidades y/o movimientos anormales registradas durante el experimento (Día 17/11/2017) (Referencias: <i>LagBL=Laguna Brazo Largo</i> , <i>LagY=Laguna Yuyal</i> , <i>LagC=Laguna Canaleta</i> , <i>LagG=Laguna Gigante</i> , <i>LagVM=Laguna Vaca Muerta</i> , <i>LagS=Laguna Sur</i>).	90
36	a) Recambio de aguas. b) Finalización del experimento.	92
37	Gráficos de puntos para cada una de las concentraciones de las lagunas. a) 100%. b) 75%. c) 50%. d) 25% (Referencias: <i>S=Laguna Sur</i> , <i>VM=Laguna Vaca Muerta</i> , <i>G=Laguna Gigante</i> , <i>C=Laguna Canaleta</i> , <i>BL=Laguna Brazo Largo</i> , <i>Y=Laguna Yuyal</i> y <i>Can=Control</i>).	92-93
38	Porcentaje de individuos por estadio en cada una de las lagunas correspondiente a la concentración 100% (Referencias: <i>LagS=Laguna Sur</i> , <i>LagVM=Laguna Vaca Muerta</i> , <i>LagG=Laguna Gigante</i> , <i>LagC=Laguna Canaleta</i> , <i>LagBL=Laguna Brazo Largo</i> y <i>LagY=Laguna Yuyal</i>).	94
39	Porcentaje de individuos por estadio en cada una de las lagunas correspondiente a la concentración 75% (Referencias: <i>LagS=Laguna Sur</i> , <i>LagVM=Laguna Vaca Muerta</i> , <i>LagG=Laguna Gigante</i> , <i>LagC=Laguna Canaleta</i> , <i>LagBL=Laguna Brazo Largo</i> y <i>LagY=Laguna Yuyal</i>).	95
40	Porcentaje de individuos por estadio en cada una de las lagunas correspondiente a la concentración 50% (Referencias: <i>LagS=Laguna Sur</i> , <i>LagVM=Laguna Vaca Muerta</i> , <i>LagG=Laguna Gigante</i> , <i>LagC=Laguna Canaleta</i> , <i>LagBL=Laguna Brazo</i>	96

Largo y LagY=Laguna Yuyal).

- 41 Porcentaje de individuos por estadio en cada una de las lagunas correspondiente a la concentración 25% (*Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).* 97

RESUMEN.

La intensificación agrícola es una de las principales causas de la destrucción del hábitat y la posterior pérdida de biodiversidad, debido principalmente al creciente uso de agroquímicos a escala local y la pérdida de hábitats naturales a escala de paisaje. En este sentido, las prácticas agrícolas orgánicas conservan más el medio ambiente y son consideradas como de baja intensidad agrícola, mientras que la agricultura convencional, dependiente de la utilización rutinaria de agroquímicos y aplicaciones de nutrientes inorgánicos en la producción de cultivos, se la considera como de alta intensidad agrícola. Resulta particularmente serio el efecto sobre los ambientes acuáticos que se podría estar ocasionando sobre poblaciones de animales en diferentes niveles tróficos y generando riesgos ecotoxicológicos sobre la salud medio ambiental y humana. Los anfibios por su particular dependencia del agua, y por su sensibilidad a los cambios ambientales, pueden estar afectados por las perturbaciones de la actividad agrícola-ganadera. Esto teniendo en cuenta que, la intensificación de la agricultura se discute como uno de los factores más importantes en la disminución de las poblaciones de anfibios a nivel mundial. En este estudio, se evaluó y monitoreó a través de estudios ecotoxicológicos los efectos producidos por distintos tipos de manejo agrícola sobre las poblaciones de anfibios para determinar su capacidad como indicadores de calidad ambiental en cuerpos de agua asociados a agroecosistemas de la región sureste de la provincia de Córdoba. Determinando el estado fisiológico en términos de riesgos genéticos y hematológicos, conjuntamente con la supervivencia embrionaria, de dos especies de anfibios anuros (*Rhinella arenarum* y *Leptadactylus latrans*) para evaluar así su capacidad como organismos centinelas.

Los resultados obtenidos indicaron que a través de la caracterización de lagunas se puede establecer un gradiente de perturbación para diferenciar a aquellas lagunas más afectadas por la intensificación agrícola-ganadera de aquellas menos afectadas de la siguiente manera: laguna Brazo Largo como la más afectada, seguido de laguna Vaca Muerta, laguna Gigante, laguna Canaleta, laguna Sur y laguna Yuyal, como la menos afectada. Las lagunas más perturbadas se trataban de las localizadas en lotes con prácticas orgánicas y convencionales a la vez. Para corroborar dicho gradiente, se realizó un análisis de componentes principales sobre las variables físico-químicas y ambientales del agua, y un

modelo lineal generalizado para las variables biológicas. LagY y LagC con elevados valores de conductividad. LagS Y LagVM presentaron valores elevados de As- y F-. Los PO_4^{3-} para LagBL, LagC y LagVM. NO_3^- para LagBL y LagC. Y Cl- para LagG. En el análisis de correspondencia canónica se observó algo similar. LagBL y LagC presentaron altos valores de NO_3^- y PO_4^{3-} , afectando a los micronúcleos de ambas especies respecto al resto de las lagunas. LagVM y Sur mayor turbidez, F- y As que afectaron a las anormalidades celulares. Mientras que laguna Gigante mayores Cl-, los eosinófilos y neutrófilos. Por último, laguna Yuyal varió sus valores conforme a la estación del año. Los parámetros biológicos coincidieron de manera efectiva con estos resultados. Los individuos de *R. arenarum* en las LagBL, LagVM y LagC presentaron diferencias para las anormalidades nucleares eritrocitarias y micronúcleos. Al igual que para las anormalidades citotóxicas totales. Con respecto a la especie, *L. latrans* se registraron mayores anormalidades nucleares eritrocitarias y micronúcleos para los individuos de LagY, mientras que mayores anormalidades citotóxicas totales para los individuos de LagS. Además, se observó mediante pruebas ecotoxicológicas basadas en condiciones estandarizadas del test ANFITOX y realizadas en los estadios larvales tempranos de las especies de anfibios anuros, que la calidad del agua de las lagunas coincidió con lo registrado por los parámetros biológicos con un 10% de mortalidad para LagBL al 100% de concentración y LagVM al 75% de concentración. En este sentido, la mortalidad de los individuos se generó en las aguas provenientes de las lagunas orgánicas/convencionales de acuerdo a la intensidad agrícola-ganadera. Registros de inmovilidad, región ventral edematizada, natación invertida y en círculos también se detectaron para LagVM. Una vez finalizado el experimento, la longitud total de los individuos fue menor para aguas provenientes de LagVM. Lo cual indicó un menor desarrollo de los individuos para esta laguna. Si bien no pudo probarse la primer hipótesis, el análisis de todas las respuestas biológicas de ambas especies, conjuntamente con el análisis de las variables físico-químicas a través de la caracterización, permitió establecer el estado de salud de los organismos y del ambiente en cuerpos de agua en estos agroecosistemas. Futuras investigaciones resultarían necesarias para completar la relación entre causa y efectos de la intensificación agrícola-ganadera sobre cualquier nivel de organización biológica. Sería de suma importancia evaluar también el estado poblacional de estas especies analizando parámetros ecológicos

tales como reclutamiento, edad, dieta de adultos, riqueza de ensamble de anfibios, entre otras permitirán obtener una visión más general y holística del estado de conservación de los anfibios que habitan esta región. Finalmente, se deben continuar con los monitoreos ampliando no solo el seguimiento de otras especies de anuros sino también al resto de los vertebrados presentes en los agroecosistemas.

ABSTRACT.

Agricultural intensification is one of the main causes of habitat destruction and the subsequent loss of biodiversity, mainly due to the growing use of agrochemicals on a local scale and the loss of natural habitats at the landscape scale. In this sense, organic agricultural practices conserve the environment more and are considered as low agricultural intensity, while conventional agriculture, dependent on the routine use of agrochemicals and applications of inorganic nutrients in crop production, is considered as of high agricultural intensity. The effect on aquatic environments that could be causing populations of animals at different trophic levels and generating ecotoxicological risks on environmental and human health is particularly serious. Amphibians, because of their particular dependence on water, and because of their sensitivity to environmental changes, may be affected by disturbances in agricultural-livestock activity. This taking into account that, the intensification of agriculture is discussed as one of the most important factors in the decline of amphibian populations worldwide. In this study, the effects of different types of agricultural management on amphibian populations were evaluated and monitored through ecotoxicological studies to determine their capacity as indicators of environmental quality in bodies of water associated with agroecosystems in the southeastern region of the province from Cordoba. Determining the physiological state in terms of genetic and hematological risks, together with the embryonic survival, of two species of anuran amphibians (*Rhinella arenarum* and *Leptadactylus latrans*) to evaluate their capacity as sentinel organisms.

The results obtained indicated that through the characterization of lagoons a disturbance gradient can be established to differentiate those lagoons most affected by agricultural-livestock intensification from those less affected as follows: Laguna Brazo Largo as the most affected, followed of Vaca Muerta lagoon, Giant lagoon, Canaleta lagoon, South lagoon and Yuyal lagoon, as the least affected. To corroborate this gradient, an analysis was made of the main components of the physical-chemical and environmental variables recorded in the field, and a generalized linear model for the biological variables. And finally, an analysis of canonical correspondence, where Laguna Brazo Largo and Canaleta presented high values of NO_3^- and PO_4^{3-} , with respect to the rest of the lagoons. Laguna

Vaca Greater turbidity, F- and As. While Gigante and Sur lagoons did not present significant environmental variables. Finally, Laguna Yuyal varied its values according to the season of the year. The biological parameters coincided effectively with these results. The individuals of *R. arenarum* in the Brazo Largo, Vaca Muerta and Canaleta lagoons presented differences for the erythrocyte and micronucleus nuclear abnormalities. As for the total cytotoxic abnormalities. With regard to the species, *L. latrans*, higher erythrocyte and micronucleus nuclear abnormalities were recorded, while greater total cytotoxic abnormalities were recorded for the individuals of the Brazo Largo, Vaca Muerta, and Canaleta lagoons. It should be noted that, although for both species, the Yuyal and Sur lagoons showed high values of genetic and cytotoxic abnormalities for some cases, this may be due to the connection with neighboring lagoons, runoff and / or contact with groundwater. In addition, it was observed by ecotoxicological tests based on standardized conditions of the ANFITOX test and carried out in the early larval stages of anuran amphibian species, that the water quality of the lagoons coincided with that recorded by the biological parameters with a 10% mortality for the Long Arm lagoons at 100% concentration and Vaca Muerta at 75% concentration. In this sense, the mortality of the individuals was generated in the waters coming from the lagoons most affected by the agricultural-livestock intensity. Immobility records, edematized ventral region, inverted swimming and in circles were also detected for the same lagoons and Canaleta lagoon. Once the experiment was completed, the total length of the individuals was lower for waters from the Vaca Muerta lagoon. Which indicated a lower development of the individuals for this lagoon. The analysis of all the biological responses of both species, together with the analysis of the physical-chemical variables through the characterization, allowed to establish the state of health of the organisms and the environment in bodies of water most affected by agricultural intensification. livestock with respect to those less affected. Prevention measures or practices associated with conserving the ecosystem, should be taken into account given the current situation of the Pampas lagoons.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Intensificación de la agricultura

La expansión e intensificación del uso del suelo para agricultura durante el último siglo se encuentran entre los cambios inducidos por el hombre más predominante a escala global sobre el medio ambiente (Matson et al., 1997; Tilman et al., 2002; Green et al. 2005; Attademo et al., 2018).

Si bien ambos procesos (expansión e intensificación) han generado efectos considerables sobre el ambiente, la intensificación agrícola en particular ha llevado a importantes pérdidas de biodiversidad en tierras agrícolas de áreas templadas (Krebs et al., 1999; Donald et al. 2001; Benton et al., 2003), y el deterioro del suelo, agua y calidad del aire han resultado irreparables (Stoate et al., 2001; Tilman et al., 2002; Phia 2006).

Las actuales tendencias de las actividades agrícolas implican la simplificación del paisaje y una reducción de la diversidad biológica, que alcanzan una forma extrema con la expansión de los monocultivos. Las consecuencias de estas acciones, son una producción artificial que requiere de una intervención humana constante a través de una permanente utilización de insumos químicos y tecnologías mecanizadas, que si bien aumentan los rendimientos productivos, resultan en una cantidad de costos sociales y ambientales indeseables (Altieri, 1987; Peltzer et al., 2005).

La intensificación agraria incluye diversos procesos espaciales y temporales que tienen como objetivo aumentar los rendimientos de los cultivos por unidad de área, pero que han aumentado la homogeneidad de los hábitats agrícolas, causando mayor erosión del suelo, y la contaminación del aire y el agua (Stoate et al., 2001; Benton et al., 2003). Impactos negativos de intensificación de la agricultura han sido demostrado en muchas especies silvestres (Stoate et al., 2001; Robinson & Sutherland, 2002; Benton et al., 2003; Newton, 2004). Los impactos de la intensificación agrícola son complejos y, a menudo, difíciles de identificar dado que los diferentes procesos pueden interactuar y afectar a los organismos tanto directamente como indirectamente (Robinson & Sutherland, 2002; Benton et al. 2003).

Para el caso de los anfibios, de acuerdo a Phia et al., 2006, la intensificación agrícola afecta características de los hábitats naturales o seminaturales, tales como el desarrollo de la

vegetación para la reproducción en los márgenes de las lagunas y bordes de los campos para alimentarse (Vos & Stumpel, 1995). Además, el uso incrementado de agroquímicos, genera mayor homogeneidad del paisaje, produce una reducción de las especies y diversidad estructural de la vegetación, contaminación del suelo, aire, y aguas subterráneas y superficiales (Davidson, 2004). Así mismo, aumenta los drenaje e irrigación produciendo mayor erosión y menor suministro de agua en los cuerpos de agua (Johansson et al., 2005).

En base a todo lo planteado anteriormente, el modelo actual de intensificación agrícola no es sostenible, no es ecológico ni ecoeficiente, ni es efectivo para alimentar al mundo, y contribuye a la pérdida de biodiversidad (Tilman et al., 2002; Foley et al., 2005; Grau et al., 2005; Rand et al., 2006; Fischer et al., 2007; Kleijn et al., 2009; Geiger et al., 2010; Godfray et al., 2010; Barnosky et al., 2011). Estas son señales indiscutibles de la realidad y marcan una necesidad urgente de formas alternativas de manejo agrícola (Tifton, 2014).

1.2. Alternativas a los sistemas convencionales de agricultura

De la situación descrita anteriormente, se han planteado grandes desafíos, como la necesidad de encontrar sistemas agrícolas alternativos para evitar consecuencias sociales negativas y permitir la conservación de la biodiversidad. La agricultura orgánica ha sido propuesta como un sistema alternativo (IFOAM, 2012). Se sabe que las prácticas agrícolas orgánicas conservan más el medio ambiente y son consideradas como de baja intensidad, mientras que la agricultura convencional, dependiente de la utilización rutinaria de agroquímicos y aplicaciones de nutrientes inorgánicos en la producción de cultivos, se la considera como de alta intensidad (Bengtsson et al., 2005; Gonthier et al., 2014). Los sistemas agrícolas europeos, difieren de los sistemas agrícolas argentinos (D'Acunto et al., 2014). Los cuales consisten en un mosaico de tierras de cultivo homogéneo hecho de grandes campos cultivables y una red dispersa de hábitats lineales, tales como, bordes de campos, bordes de caminos y vías férreas que mantienen la cobertura de plantas de flora nativa y malezas introducidas durante todo el año. Estos hábitats lineales con frecuencia reciben una aplicación de agroquímicos intencional o no intencional de los cultivos vecinos (Ghersa et al., 2002; De la Fuente et al., 2010; Poggio et al., 2010). A pesar de las grandes diferencias estructurales y funcionales entre los sistemas agrícolas de Argentina y Europa,

los hábitats lineales también pueden atenuar los efectos de la intensificación agrícola al proporcionar hábitats adecuados para la conservación de la biodiversidad de especies en ambientes modificados (Simone et al., 2010; Gómez et al., 2011; Coda et al., 2015).

En Argentina actualmente hay 3,6 millones de hectáreas bajo prácticas orgánicas, sólo 240.000 hectáreas están destinadas a la producción de cultivos, mientras que el resto se dedica a pasturas para la ganadería (SENASA, 2013). La zona sur-este de la provincia de Córdoba (Departamentos de Juárez Celman, Unión y Marcos Juárez) presenta aproximadamente 1.879.900 hectáreas en producción de cultivos, y sólo 7.344 hectáreas de éstas, están bajo manejo orgánico (MAGyA, 2013; SENASA, 2013).

Varios estudios realizados en Europa, principalmente en plantas (Holzschuh et al., 2007), insectos (Dritschilo & Wanner, 1980), aves (Beecher et al., 2002) y mamíferos (Macdonald et al., 2007) han demostrado que las prácticas de agricultura orgánica pueden contrarrestar los impactos negativos de la intensificación de la agricultura. Mientras que, en Argentina, es escasa la información sobre los beneficios al ambiente de este tipo de manejo. (Bedano et al., 2006; Domínguez et al., 2009; Bedano et al., 2011; Coda et al., 2014, Gomez et al., 2014; Coda et al., 2015, 2016; Bedano et al., 2016; Gómez et al., 2017, 2018).

En el caso particular de los anfibios anuros, Attademo et al., 2018 observaron una mayor diversidad en cultivos de arroz orgánico versus tradicional en la provincia de Santa Fe. Sin embargo, no existen estudios para el resto de Argentina. Es importante considerar que los anfibios anuros se asocian directamente a los cuerpos de agua, y es compleja la comparación de los efectos de la agricultura orgánica y convencional sobre los cuerpos de agua ya que estos están sujetos a fenómenos como escorrentías, lixiviado etc, de distintas sustancias provenientes de sistemas convencionales colindantes, impidiendo identificar los efectos de la agricultura convencional y orgánica de aquellos generados por otros factores de estrés intrínsecos de los agroecosistemas (Boone et al., 2009).

La agricultura convencional conlleva distintos sistemas de manejo que producen cambios físicos de la estructura en particular, mediante la formación de compactaciones. La pérdida de nutrientes, salinización, acidificación y la contaminación por fertilizantes y herbicidas. De manera muy general, la más dramática innovación tecnológica en la agricultura argentina fue la introducción en 1996 de la soja genéticamente modificada

tolerante al glifosato (Manuel-Navarrete et al., 2009; Dominguez et al., 2015), convirtiendo actualmente a la Argentina como el tercer productor mundial de soja (*Glycine max* Merrill) y utilizando una cantidad considerable de agroquímicos (Bionda et al., 2011b). El glifosato es un herbicida de amplio espectro, que conjuntamente con la siembra directa han dominado y cambiado el rumbo de la agricultura convencional. La agricultura convencional presenta seis elementos básicos e interdependientes: poca diversidad genética (monocultivo); variedades híbridas altamente productivas pero en muchos casos poco resistentes a plagas y enfermedades; nutrición basada en productos sintéticos altamente solubles; mecanización de procesos; mayores demandas del recurso hídrico; y alto uso de insumos biocidas (Manuel-Navarrete et al., 2009).

Por otra parte, agricultura orgánica intenta restablecer el balance ecológico de los agroecosistemas de manera de alcanzar una producción sustentable. La biodiversidad promueve una variedad de procesos de renovación y servicios ecológicos en los agroecosistemas; que cuando estos se pierden, los costos pueden ser significativos. De acuerdo a Codex, organismo asociado a la FAO, la agricultura orgánica es un sistema de manejo holístico de la producción que promueve y mejora la salud del ecosistema, incluyendo los ciclos biológicos y la actividad biológica del suelo. Se basa en el uso mínimo de insumos externos y evita los fertilizantes y plaguicidas sintéticos (Hattam et al., 2003). Aquí las malezas son utilizadas como forraje, estiércol utilizado como fertilizante, o rastrojos y malezas dejadas para pastoreo animal. La biodiversidad puede también subsidiar el funcionamiento del agroecosistema al proveer servicios ecológicos tales como el reciclaje de nutrientes, el control biológico de plagas y la conservación del agua y del suelo (Altieri & Nichols, 1999).

Considerando la capacidad de intervención humana, la salud de los agroecosistemas depende principalmente de los usos y cuidados indispensables que requieren estos lugares para mantenerse en el tiempo y espacio (Mujica et al., 2011).

1.3. Calidad de los cuerpos de agua

El agua en sus diversos estados es uno de los componentes básicos que sostiene a los ecosistemas. Analizar los recursos hídricos y además los aspectos ambientales asociados,

implica necesariamente el conocimiento de su dinámica global y de todos aquellos factores que condicionan su calidad (Blarasin et al., 2005). Como acción de diversos factores (geológicos, climáticos) el agua puede variar sus características físico-químicas y de este modo su calidad. Sin embargo, el crecimiento demográfico del planeta significó la aparición de una vasta gama de actividades humanas generadoras de sustancias que pueden contaminar el agua (Blarasin et al., 2005).

Las lagunas pampeanas son cuerpos de agua de llanura, muy poco profundos, que no estratifican térmicamente, excepto por períodos muy cortos de tiempo; fueron caracterizadas por Quirós & Drago (1999) como lagos muy poco profundos, con tiempo de permanencia del agua y salinidad altamente variables, naturalmente eutróficos y actualmente bajo estrés ambiental, que incrementa aún más sus contenidos de nutrientes. La gran mayoría de las lagunas presentan una hidroquímica altamente variable, mientras que las lagunas más salinas se sitúan en las cuencas hidrológicamente más aisladas (Quirós & Drago, 1999). Su concentración salina permite clasificarlas como lagos subsalinos y salinos (Ringuelet, 1962; Ringuelet et al., 1967; Drago & Quirós, 1996) y, en algunos casos, como lagos de agua dulce (<0.5 g/L de sólidos disueltos totales). Como lagos de llanura, su hidrología es altamente dependiente de las precipitaciones *in situ* (Fuschini Mejía, 1994), principalmente de aquellas que se producen hacia fines del otoño (Vervoort, 1967). En las áreas menos salinas y con menor desarrollo humano, la vegetación arraigada generalmente cubre, en parches y con extensión variable, la superficie de las lagunas.

La estepa pampeana ha sufrido el pastoreo del ganado a lo largo de los últimos cuatro siglos y, especialmente durante el siglo XX, ha sido objeto de la agricultura (Vervoort 1967; Soriano 1992). Como resultado de ello, los patrones naturales del paisaje pampeano han sido transformados, aislando espacialmente sus componentes, fragmentándolo en parches (Quiroz et al., 2002).

La región pampeana es el paisaje más productivo de Argentina. Paradójicamente, la ecología de las lagunas pampeanas ha sido relativamente poco estudiada. La falta de información generalmente ha impedido la conceptualización mínima necesaria para desarrollar medidas adecuadas de manejo sustentable. Sin embargo, numerosas especies de anfibios anuros han sido capaces de persistir en paisajes agrícolas a pesar de las profundas modificaciones que sufren los cuerpos de agua presentes en estos ecosistemas, sin embargo

se observa una tendencia a la disminución de la densidad y diversidad de anfibios anuros que habitan paisajes agrícolas

1.4. Efectos sobre los anfibios

Aproximadamente un tercio de las especies de anfibios del mundo son amenazadas y al menos el 43% de todas las especies han disminuido (Stuart et al. 2004). La pérdida y degradación del hábitat se encuentran entre las mayores amenazas de la disminución de las poblaciones, sin embargo, se deben incluir pesticidas y otros contaminantes químicos, aumento de la radiación UV-B, cambio climático, introducción de depredadores, enfermedades y explotación (Collins & Storer, 2003; Beebe & Griffiths, 2005; Pounds et al., 2006). Como consecuencia de esto, se registran poblaciones de anfibios con incidencias inesperadamente altas de anomalías morfológicas (Blaustein & Johnson, 2003; Sessions, 2003; Peltzer et al., 2011). Una probable causa es que los estresores que las ocasionan no funcionan independientemente, sino que interactúan entre ellos, resultando una amenaza no solo para los anfibios sino para muchas especies (Kiesecker et al., 2001; Blaustein & Kiesecker 2002; Pounds et al. 2006).

En estudios recientes, sobre los efectos de intensificación agrícola sobre la biodiversidad, los anfibios generalmente han tenido poca relevancia (Stoate et al., 2001; Robinson & Sutherland, 2002; Hole et al., 2005). Esto es bastante contradictorio, ya que para los herpetólogos una de las principales amenazas se encuentran asociados a diversos procesos relacionados con la intensificación agraria (Joly et al., 2001; Linder et al., 2003; Semlitsch, 2003; Knutson et al., 2004; Relyea et al., 2005), y de ser responsable de la disminución global de las poblaciones de anfibios (Phia, 2006).

Varios factores intrínsecos y extrínsecos pueden aumentar la probabilidad de que los anfibios sean sensibles a la intensificación agrícola. En primer lugar, muchas especies de anfibios tienen fuertes fluctuaciones anuales de sus poblaciones (Pechmann et al., 1991; Meyer et al., 1998; Trenham et al., 2003), alta fidelidad del sitio (Smith & Green, 2005), y baja dispersión (Sinsch, 1990; Smith & Green, 2005), que puede hacerlos particularmente sensibles a efectos de aislamiento (Bishop et al., 1999; Knutson et al., 2004; Davidson et al.,

2004). En segundo lugar, poseen tegumento semipermeable que los protegen débilmente contra los contaminantes y la sequedad (Feder & Burggren, 1992).

Los anfibios por su particular dependencia del agua y por su sensibilidad a los cambios ambientales, son afectados por las perturbaciones de la actividad agrícola-ganadera (Young et al., 2004; Bionda et al., 2011; Lenhardt et al., 2015). Esto teniendo en cuenta que, la intensificación de la agricultura se discute como uno de los factores más importantes en la disminución de las poblaciones de anfibios a nivel mundial (Lenhardt et al., 2015). Las particularidades de este grupo taxonómico como su doble ciclo de vida (acuático y terrestre) y su piel muy permeable que intercambia materiales con el medio (Welsh & Ollivier, 1998; Manzanilla & Péfaur, 2000; Cabagna et al., 2005; Lascano et al., 2009; Blaustein et al., 2011) los hacen aún más sensibles que mamíferos y aves a la absorción dérmica de productos químicos (Lenhardt et al., 2015), por lo que resultan ser buenos bioindicadores de la salud ambiental (Young et al., 2004).

Las alteraciones en los ambientes acuáticos o el deterioro en la calidad de los mismos, puede influir en distintos parámetros de las poblaciones de los anuros. El uso de biomarcadores, entre los que se encuentran el test de Micronúcleos (MN), Anormalidades Nucleares Eritrocitarias (ANE) (Ergene et al., 2007; Pollo et al., 2012) como anormalidades genotóxicos, y anormalidades citotóxicas tales como el recuento de eritrocitos inmaduros, amitosis, anucleados, etc. (Guilherme et al., 2008), conjuntamente con la fórmula leucocitaria (Cabagna et al., 2005; Cabagna et al., 2011; Salinas et al., 2015; Salinas et al., 2017) son importantes para la evaluación de las alteraciones a largo plazo (subcrónicas y crónicas) sobre los organismos expuestos a xenobióticos. Anormalidades morfológicas en etapas tempranas y en adultos, sirven de referencia para considerar la incidencia de estos cambios sobre la población de anuros. La condición corporal, es un indicador del estado fisiológico de un organismo, que depende de la oferta y disponibilidad trófica de los distintos ambientes en que habitan, resultando una herramienta útil para la caracterización y monitoreo de la calidad ambiental (Bionda et al., 2012). Y por último, los estadios embrionarios y larvales tempranos de los anfibios propuestos por Herkovits et al., (1996) son buenos bioindicadores para pruebas de toxicidad diagnósticas y monitoreo ambiental. Esto debido a que, alteraciones en los ambientes acuáticos se asocian a características como el tiempo y tamaño alcanzado en la metamorfosis (Carey & Bryant, 1995; Taylor et al.,

2005; Alitg et al., 2007). El análisis del estado de salud de los estadios embrionarios y larvales de los anfibios constituye un buen indicador de la calidad y salud del ambiente (Babini et al., 2018; Herkovits et al., (1996). De acuerdo a (Lajmanovich et al., 1998) a diferencia de las pruebas de toxicidad que sólo estudian los efectos inmediatos, no son suficientes para medir el riesgo de los ecosistemas en su conjunto, por lo que se requiere de complementar con métodos biológicos que den una noción de los sucesos a largo plazo.

Por ello, consideramos necesario el análisis de diversos parámetros ecotoxicológicos para determinar el estado de salud en el que se encuentran las poblaciones de anfibios a escala local como producto de los distintos tipos de manejos agrícolas. A su vez, esto nos permitiría conocer la calidad ambiental de los cuerpos de agua asociados a la actividad agrícola del sureste de la provincia de Córdoba.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPOTESIS

H1: Los cuerpos de agua asociados a manejos agrícolas intensivos (convencionales) están más perturbados con respecto a los cuerpos de agua asociados a manejos agrícolas menos intensivos (orgánicos).

H1: Las variables ambientales (indicadores de calidad) de los cuerpos de agua asociados a manejos agrícolas intensivos están perturbadas con respecto a los cuerpos de agua asociados a manejos agrícolas menos intensivos.

H2: Los individuos presentes en cuerpos de agua asociados a manejos agrícolas intensivos presentan mayores frecuencias de anomalías nucleares y celulares eritrocitarias que los individuos provenientes de cuerpos de agua asociados a manejos agrícolas menos intensivos.

H3: Los individuos presentes en cuerpos de agua asociados a manejos agrícolas intensivos presentan mayores variaciones en las frecuencias de fórmula leucocitaria que los individuos provenientes de cuerpos de agua asociados a manejos agrícolas menos intensivos.

H4: Los renacuajos presentes en cuerpos de agua asociados a manejos agrícolas intensivos presentan mayor mortalidad, retraso en el crecimiento y anomalías en el comportamiento que los renacuajos provenientes de cuerpos de agua asociados a manejos agrícolas menos intensivos.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar y monitorear a través de estudios ecotoxicológicos los efectos producidos por distintos tipos de manejo agrícola sobre las poblaciones de anfibios para determinar su capacidad como indicadores de calidad ambiental en cuerpos de agua asociados a agroecosistemas de la región sureste de la provincia de Córdoba. Estudiar el estado fisiológico en términos de riesgos genéticos y hematológicos, conjuntamente con la supervivencia embrionaria, determinando así su capacidad como organismos centinelas.

2.2.1. Objetivos específicos

- a. Caracterizar a través de variables físico-químicas las lagunas y charcas temporarias ubicadas al sureste de la provincia de Córdoba a escala local y de paisaje en función al grado de perturbación generada por la intensificación agrícola-ganadera.
- b. Comparar la presencia de alteraciones genotóxicas y citotóxicas en organismos adultos de especies de anfibios anuros como indicador de la calidad de las lagunas asociadas a distintos grados de perturbación agrícola-ganadera.
- c. Analizar la fórmula leucocitaria en organismos adultos de especies de anfibios anuros como indicador de la calidad de las lagunas asociadas a distintos grados de perturbación agrícola-ganadera.
- d. Analizar la condición corporal de anfibios anuros adultos que habitan y se reproducen en lagunas asociadas a distintos grados de perturbación agrícola-ganadera como un indicador biológico de la calidad del ambiente.
- e. Comparar la mortandad, comportamiento y desarrollo de estadios larvales tempranos en agua de lagunas asociadas a distintos grados de perturbación agrícola-ganadera mediante pruebas ecotoxicológicas basadas en condiciones estandarizadas del test ANFITOX, como una respuesta biológica indicadora de la salud ambiental.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del área

El área de estudio se ubica al sureste de la provincia de Córdoba (Figura 1). Pertenece a la provincia fitogeográfica de Estepa Pampeana. Incluye formaciones de estepas y praderas, en su mayor parte. La vegetación predominante es el pasto, principalmente Poaceae y plantas herbáceas que dependen principalmente del suelo y el clima de la región (Luti et al., 1979). Sin embargo, el avance de la agricultura ha reducido estas áreas naturales a pequeños relictos que generan procesos erosivos y el transporte de sedimentos por los sistemas hidrológicos superficiales. En general, ambos procesos presentan un uso actual del territorio mixto con predominio agrícola, donde la actividad agrícola supera al ganado (70%). Están mejor desarrollados, bien drenados y en suelos climáticamente húmedos donde se cultivan maíz, girasol y soja, principalmente en verano. Pero parte del área está destinada a pastos y forrajes para el ganado en invierno (Blarasin et al., 1994).

Estancia Altos verdes con 1010 hectáreas de cultivo, pertenece a la ecorregión del Espinal. Se trata de una eco-región de la llanura Chaco-Pampeana, que rodea por el norte, oeste y sur a la Eco-región de La Pampa, abarcando el sur de la Provincia de Corrientes, mitad norte de Entre Ríos, una faja central de Santa Fe y Córdoba, centro y sur de San Luis, mitad este de La Pampa y sur de Buenos Aires. El paisaje predominante es de llanura plana a suavemente ondulada, ocupada por bosques bajos, sabanas y pastizales, hoy convertidos en gran parte a la agricultura. Las características de los suelos es variable. Hacia el noreste de la eco-región, los suelos están formados sobre sedimentos loésicos, arcillosos e imperfectamente drenados. Hacia el centro-oeste y sur de la región, son mediana a pobremente desarrollados, de texturas gruesas, escasamente provistos de materia orgánica, sin presencia de capas de acumulación de arcilla y, principalmente hacia el sur, con presencia de capas petrocálcicas y zonas medanosas (Bilenca & Miñarro, 2004).

Estancia Las Gaviotas y Las Dos Hermanas, con 1689 y 4023 hectáreas destinadas a cultivo respectivamente, pertenecen a la ecorregión de la Pampa. Esta ecorregión comprende el oeste de la provincia de Buenos Aires, norte y este de La Pampa, sur de Córdoba y sureste de San Luis. Por sus características internas se puede dividir en dos

grandes unidades: la “plana”, al este y “oeste”. Existen limitaciones climáticas para las prácticas agrícolas muy severas en el oeste, con niveles de precipitación muy bajos para realizar una agricultura de secano, así el uso actual se basa en el pastoreo extensivo sobre campos naturales o seminaturales. En el este, las condiciones más favorables para la agricultura están en las lomadas o en los llanos altos (INTA-SAGyP, 1990). La aptitud de las tierras es agrícola-ganadera y ganadero-agrícola en similares proporciones, según se trate de paisajes altos y estables o áreas medanosas o bajas (INTA-SAGyP, 1990). El paisaje en la región es muy llano, sin embargo en las cercanías de los grandes ríos se vuelve ligeramente ondulado, y ha producido una red de drenaje poco definida, existiendo grandes cuencas arreicas caracterizadas por la presencia de lagunas permanentes o temporarias, con amplias zonas afectadas por la salinización, especialmente en el este, donde las precipitaciones son mayores. En cuanto a las características edáficas, la textura decrece marcadamente de oeste a este. La pampa húmeda (es decir la mayor parte de la provincia de Buenos Aires, los 2/3 meridionales de la de Santa Fe, las 3/4 partes occidentales y meridionales de la de Córdoba y el cuarto este de la de La Pampa) tiene profundos y ricos suelos abundantes en humus (predominando el suelo afín al loess) lo que propicia -merced a una pluviometría superior a los 500 mm/año- la existencia natural de importantes pastizales de gramíneas o directamente praderas; aunque actualmente (si la zona no está cultivada) suelen percibirse praderas (los "montes" o bosques de algarrobos, piquillines y caldenes o han sido talados o han sido muy reducidos y devastados. Antes de la llegada de los grandes rebaños europeos (hacia 1537) la mayor parte de la cobertura pampeana era una estepa de altos y duros pastizales (Bilenca & Miñarro, 2004).

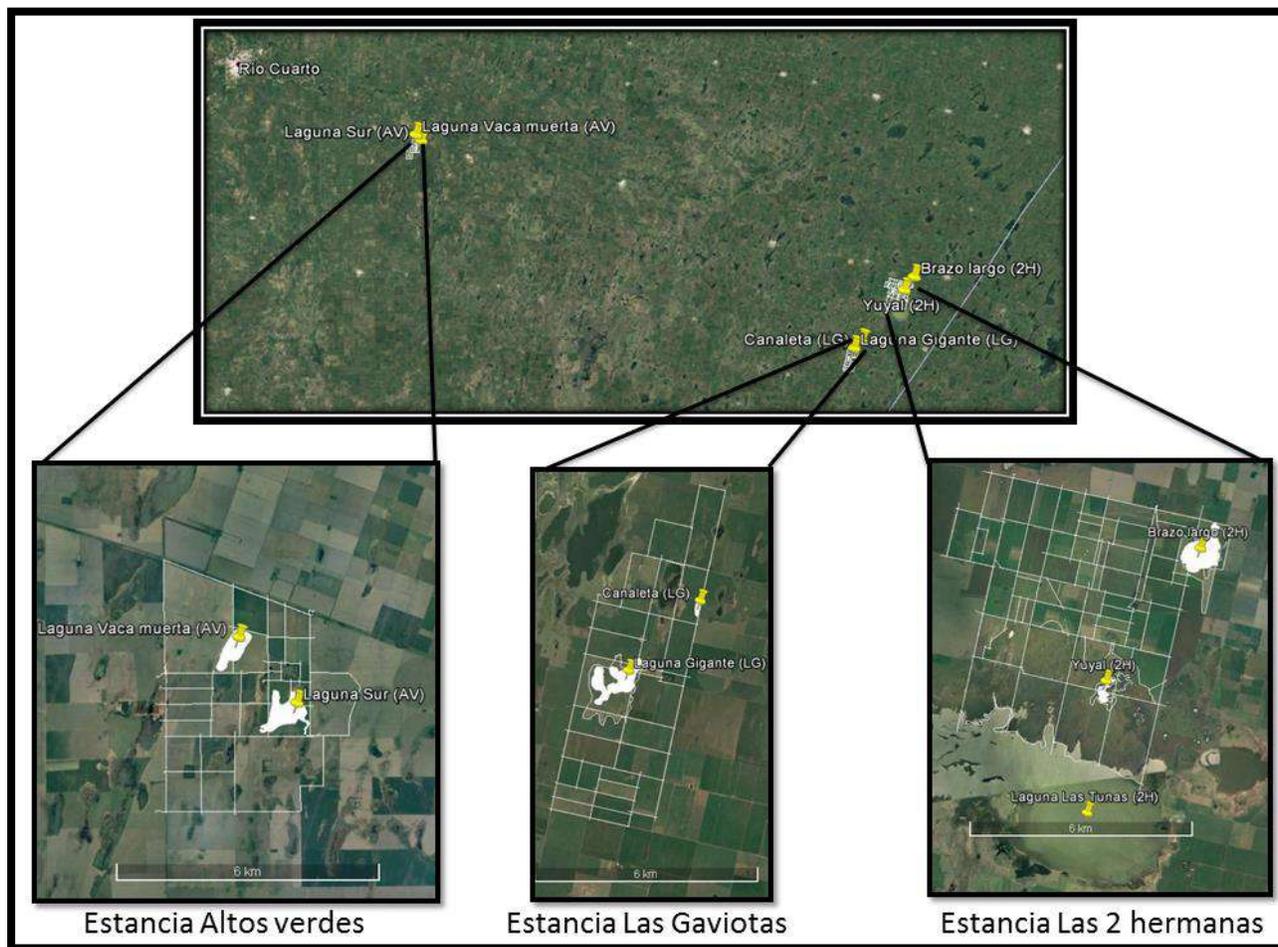


Figura 1. Área de estudio seleccionada (*Referencias: AV=Estancia Altos Verdes, LG=Estancia Las Gaviotas, 2H=Estancia Las Dos Hermanas*).

Se seleccionaron seis sitios de muestreo con diferente grado de perturbación antrópica: LagVM (Figura 2a) (coordenadas 33 ° 19'22.70 " S, 63 ° 52'20.16 " W, 247 m.a.s.l): el paisaje rural tiene un estanque permanente asociado con cultivos orgánicos y campos vecinos convencionales. Además, los animales muertos, como el ganado, se depositan en uno de los márgenes de dicho estanque (O/C= convencional). LagS (Figura 2b) (coordenadas 33 ° 20'11.19 "S, 63 ° 51'29.01" W, 243 m.a.s.l): el paisaje rural presenta un estanque permanente asociado a diferentes cultivos orgánicos (O= orgánico). LagG (Figura 2c) (coordenadas 33 ° 20'23.53 "S, 62 ° 40'1.90" W, 123 m.a.s.l): laguna de gran tamaño que se une con otra importante laguna durante las estaciones de lluvia. Este sitio está asociado con cultivos como la soja, el trigo y el maíz de agricultura convencional (C= convencional). LagC (Figura 2d) (coordenadas 33 ° 49'22.61 " S, 62 ° 38'47.78 " W, 125

msnm) paisaje de cultivo (maíz, maní, trigo, soja) que presenta un estanque temporal formado durante los períodos de las mayores lluvias por el desbordamiento de un canal que transita ambos lados de un camino rural. Dicho canal recibe escorrentía de diferentes campos (C= convencional). LagBL (Figura 2e) (coordenadas 33 ° 39'58.42 "S, 62 ° 30'8.00" W, 120 m.a.s.l) campo sin cultivar con presencia de ganado (con rotación). El estanque presente en este lote es permanente y poco profundo, pero compartido con un campo colindante convencional, y donde también hay ganado (O/C= orgánico/convencional). LagY (Figura 2f) (coordenadas 33 ° 41'54.77 "S, 62 ° 31'45.25" W, 117 m.a.s.l) paisaje natural típico de Estepa Pampeana sin ganado donde no se practica agricultura en 40 años. Cuenta con un estanque temporal con abundante vegetación costera y plantas flotantes (O= orgánico).

Figura 2. Lagunas de muestreo. a) Laguna Vaca Muerta (LagVM), b) Laguna Sur (LagS), c) Laguna Gigante (LagG), d) Laguna Canaleta (LagC), e) Laguna Brazo Largo (LagBL), f) Laguna Yuyal (LagY).



a) Lag VM. Laguna Vaca Muerta.



b) Lag S. Laguna Sur.



c) Lag G. Laguna Gigante.



d) Lag C. Laguna Canaleta.



e) Lag BL. Laguna Brazo



f) Lag Y. Laguna Yuyal.

En función a los datos anteriormente mencionados confeccionamos la siguiente tabla 1:

Tabla 1. Clasificación esperada de las lagunas estudiadas en función de los tipos de manejos a los que se encuentran asociadas.

Tipo de manejo	Convencional (C)		Orgánico/Convencional (O/C)		Orgánico (O)	
Laguna	LagG	LagC	LagBL	LagVM	LagS	LagY

La Estancia Las Dos Hermanas siempre ha estado bajo manejo orgánico; mientras que los lotes orgánicos de las otras dos estancias han estado bajo este tipo de manejo por alrededor de 10 años. Los tres sitios siguen esquemas estrictos de rotación de cultivos, tanto en manejo orgánico como en convencional. Los principales cultivos son de soja y maíz, para las tres estancias (Coda et al., 2014). Los campos orgánicos de Las Gaviotas fueron certificados por la Organización Internacional Agropecuaria OIA en el 2014, mientras que Altos Verdes y Dos Hermanas por Argencert en el mismo año.

3.2. Especies estudiadas

Las especies de anuros seleccionadas fueron *Rhinella arenarum* y *Leptodactylus latrans* (Figura 3, 4), siguiendo los criterios de presencia de las mismas en todos los sitios, abundancia y fácil captura.

Taxonomía

Orden: Anura

Familia: Rhinellidae

Género: *Rhinella*

Espécie: *R. arenarum* Hensel, 1867

Nombre Vulgar: sapo común (Figura 3)



Figura 3. Macho y hembra adultos de *Rhinella arenarum*. Foto de Clarisa Bionda.

Con piel verrugosa y glándulas paratoideas alargadas, afinadas hacia atrás y seguidas de una línea de glándulas circulares. Presenta crestas cefálicas prominentes. Los machos suelen ser más pequeños que las hembras (LHC: 88-108 mm) y presentan el dorso de un color oliváceo o verdoso. Las hembras, algo más grandes (SVL: 93-112 mm), presentan un color oliváceo manchado con gris o viceversa (Figura 3). Presenta una diversidad fenotípica importante a lo largo de su distribución.

Se encuentra en todo tipo de ambientes, pudiendo ser hallado en Argentina desde el norte de Jujuy hasta el río Chubut, cerca de costas patagónicas. Al oeste llega hasta las costas del río Limay en Neuquén, ascendiendo hasta los 1500 msnm. En Mendoza y aún a mayores altitudes en la Rioja y Catamarca.

Se reproduce en lagunas, pantanos, charcos temporarios y piletas artificiales, comenzando en algunas zonas de Buenos Aires en el mes de Agosto y pudiendo estar activo (generalmente luego de las precipitaciones) hasta Abril. Los machos cantan dentro

del agua por lo general en grandes coros. Las hembras llegan a poner entre 4000 y 5000 huevos de color negro en una larga tira gelatinosa que queda libre en el fondo del agua (De Angelo, 2003).

Orden: Anura

Familia: Leptodactylidae

Género: Leptodactylus

Espécie: *L. latrans* Stefen, 1815

Nombre Vulgar: rana criolla (Figura 4)



Figura 4. Juvenil de *Leptodactylus latrans*. Foto: Zulma Salinas.

En general son de gran tamaño (SVL: 140 mm en los machos y 120 mm en las hembras). Presenta el dorso verdoso o pardo amarillento, con varias cadenas glandulares longitudinales y manchas grandes oscuras bordeadas de claro (Figura 4). Tiene una mancha triangular entre los ojos y el labio inferior manchado. El vientre es blanquecino y los machos se caracterizan por tener un brazo muy desarrollado y con dos espinas en el primer dedo de la mano, característica única entre especies de este género. Su distribución en el país abarca desde el extremo norte de Río Negro hasta Misiones, llegando hacia el oeste hasta el este de Mendoza.

Habitan en diversos ambientes de aguas permanentes, los machos cantan apoyados en el fondo, dentro del agua, y luego de unirse a una hembra la pareja construye un gran nido de espuma, anular y flotante, batiendo con las patas una sustancia albuminoide que produce la hembra. Las hembras defienden el nido y a las larvas, que son de hábitos gregarios (De Angelo, 2003).

3.3. Caracterización de los cuerpos de agua

Para la caracterización de los cuerpos de agua se realizó un relevamiento de variables paisajísticas, morfométricas de las lagunas y ambientales. Para ello, se tuvo en cuenta las siguientes definiciones: perturbación (latín= “perturbatio”= alteración) es una alteración en el orden natural del ciclo de un organismo o ambiente. Polución es una alteración artificial de la calidad físicoquímica del agua, suficiente para superar límites pre establecidos para un determinado fin. Mientras que contaminación, es aquella que posee organismos patógenos, sustancias tóxicas y/o radiactivas en tenores perjudiciales para la salud del hombre (Manoel Filho & Feitosa. 2000).

3.3.1. Gradiente de perturbación

Con el fin de establecer *a priori* un gradiente de perturbación de los cuerpos de agua estudiados, se tuvo en cuenta distintas características referentes a: perturbaciones de cobertura, perturbaciones de agricultura, perturbaciones de ganado, frecuencia del disturbio, conectividad e hidroperiodo (Brandolin et al., 2015; Babini, 2016).

Para cada una de estas características se establecieron variables, las cuales ponderaron de acuerdo al nivel de perturbación que significaría para las lagunas donde se desarrollaban las especies estudiadas (*R. arenarum* y *L. latrans*). La ponderación incluye valores variados de acuerdo al tipo de variable, por ejemplo entre 0 y 3. Correspondiendo al valor 0 (cero) a la característica que no implica perturbación para el hábitat y el valor más alto para la característica que implica mayor perturbación. Las características de cada sitio y su ponderación correspondiente están representados en la Tabla 2.

La perturbación total, como sumatoria de todas las ponderaciones de las distintas perturbaciones en los sitios, permite establecer un gradiente de perturbación entre los sitios. Este gradiente permite ordenar de mayor a menor perturbación los sitios de la siguiente manera: $X1 > X2 > X3 > X4$.

Tabla 2. Variables ambientales asociadas a la perturbación que reciben los cuerpos de agua en estudio.

Niveles de Perturbaciones	Variable	Definición	Valores de la variable
Cobertura	Estratos de vegetación en márgenes	Tipo de estrato de vegetación emergente del borde del cuerpo de agua.	1=herbáceas y arbustivas/ 2=herbáceas/ 3=arbustivas/ 4=ninguna
	Vegetación en márgenes	Cobertura de vegetación en los márgenes cuerpo de agua.	0=100% / 1=1-50% / 2=51-99% / 3=ninguna
	Estratos de vegetación interna	Tipo de estrato de vegetación emergente en el interior del cuerpo de agua.	1=herbáceas y arbustivas/ 2=arbustivas/ 3=herbáceas/ 4=ninguna
	Vegetación interna	Cobertura de vegetación emergente en el interior del cuerpo de agua.	0=100% / 1=1-50% / 2=51-99% / 3=ninguna
Agricultura	Distancia al cultivo	Distancia en metros al cultivo más cercano (Variable transformada a cualitativa).	0=mucha/ 1=media/ 2=poca/ 3=sobre
	Tipo de cultivo	El tipo de cultivo sumado al tamaño del lote.	0=nada/ 1=poco/ 2=mucho
	Rotación	Debido a que muchos lotes se aplica agricultura orgánica, la rotación de los cultivos es un aspecto indispensable.	0=con rotación/ 1=sin rotación/ 2=monocultivo

	Pastizal natural	Presencia de pastizales naturales en los márgenes dentro del radio de 50 m.	0=hay/ 1=no hay
Ganadería	Presencia de ganado	Presencia de ganado en los márgenes o en los mismos lotes donde están ubicados los cuerpos de agua.	0=sin ganado/ 1=medio/ 2=mucho
	Pisoteo	Pisoteo de ganado en los márgenes de los cuerpos de agua.	0=sin pisoteo/ 1=medio/ 2=mucho
Disturbios	Frecuencia de disturbios	Modificaciones naturales o antrópicas, considerando la frecuencia y el grado del disturbio.	1 = (Raro y Leve), 2 = (Raro y Grave), 3 = (Común y Leve) y 4 = (Común y Grave), Ausencia 0
Conectividad	Conexión entre cuerpos de agua	Comunicación entre cuerpos de agua.	0=No hay conectividad, 1=Hay conectividad
Hidroperiodo	Disponibilidad de agua	Lapso de tiempo que la laguna retiene agua.	0=temporario/ 1=permanente

Una vez generado el gradiente de perturbación, se utilizó el índice de perturbaciones propuesto por Munné et al., (2003), y adaptado para cuerpos de agua lénticos de acuerdo a la siguiente Tabla 3:

Tabla 3. Juicio de indicadores de impacto o perturbaciones.

Nº perturbaciones	Juicio
< 2 perturbaciones	Sin alteraciones, calidad buena, estado natural.
2 a 3 perturbaciones	Ligeras perturbaciones, calidad buena.
4 a 5 perturbaciones	Inicio de alteraciones importantes, calidad intermedia.
6 a 7 perturbaciones	Alteración fuerte, calidad mala.
>7 perturbaciones	Degradación extrema, calidad pésima.

3.3.2. Variables morfométricas de las lagunas

Se implementó un Sistema de Información Geográfica (SIG) con el fin de localizar las lagunas en estudio y asociar los manejos agrícolas-ganaderos y tipo de cultivo durante la temporada 2016-2017, coincidiendo con los periodos de mayores lluvias.

Se aplicó del programa Quantum GIS 2.14., siendo una herramienta eficaz para el estudio de variables geoespaciales (Aronoff, 1991).

Se construyó un croquis a partir de imágenes provenientes del Google Earth Pro, donde a partir de polilíneas se identificaron los cuerpos de agua y cada uno de los lotes presentes en las Estancias de interés para el estudio.

El programa permite separar la información en diferentes capas temáticas y las almacenarlas independientemente. Cuerpos de agua y lotes, por ejemplo, corresponden a temas dentro del programa QGIS una vez transformados de polilíneas a polígonos.

Para cada cuerpo de agua, la estacionalidad resulta un dato importante, ya que las lagunas varían sus tamaños en función de la carga aportada por las precipitaciones en cada estación. Se analizaron dos estaciones, cuando los anfibios se encuentran activos, primavera y verano, coincidiendo con el período reproductivo. Otro dato importante es la forma, el perímetro y el área que ocupa la laguna en cada periodo de muestreo (primavera-verano).

En el caso de los lotes, se procedió con la misma metodología y se consideró como datos de relevancia: el tipo de manejo (orgánico, convencional, si eran pasturas naturales, si

correspondía al casco de la estancia, etc.), así como también el tipo de cultivo (maíz, soja, trigo, avena).

3.3.3. Variables ambientales de calidad de agua

En la Tabla 4 a están registradas las variables ambientales y físico-químicas de calidad de agua. Para cada una de ella, se detalla una definición y los valores asignados:

Tabla 4 a. Variables registradas en primavera-verano

Variable	Definición	Valores de la variable
Turbidez	Valor medido a través del disco de Secci.	Variable cuantitativa
pH	pH del cuerpo de agua en ambas estaciones.	Variable cuantitativa
Temperatura agua	Temperatura del agua cercana a la costa.	Variable cuantitativa
Temperatura aire	Temperatura a 15cm sobre el suelo.	Variable cuantitativa
SDT	Sólidos disueltos totales	Variable cuantitativa
Conductividad	La conductividad eléctrica (μS) de agua a 25°C.	Variable cuantitativa
Salinidad	Salinidad del cuerpo de agua	Variable cuantitativa
Oxígeno disuelto (%)	Porcentaje de oxígeno disuelto medido cercano a la costa.	Variable cuantitativa
Oxígeno disuelto (ppm)	Partes por millón de oxígeno disuelto medido cercano a la costa.	Variable cuantitativa
Físicas y químicas	Conjunto de magnitudes físicas y químicas del agua de las lagunas.	Variable cuantitativa

Las variables ambientales, temperatura del aire y del agua, pH, conductividad, salinidad y solutos disueltos totales, fueron tomadas con equipo digital 35-Series Test TM Multiparámetro 35425- 10. El oxígeno disuelto fue medido con un Oxímetro digital Trans Instruments HD3030. También se tomaron muestras de agua en el mismo sitio de cada laguna donde los anfibios se reproducían para realizar los análisis físico-químicos, siguiendo los lineamientos sugeridos por APHA (2005). Para dicho análisis, se tomaron dos

litros de agua teniendo en cuenta que las mismas fueran homogéneas y representativas, y por sobre todo que en la extracción no se modifiquen las propiedades del agua a analizar, se utilizaron envases de plástico limpios. Se recolectaron a profundidad media destapando el recipiente y rápidamente se lo sumergió. Una vez lleno, se levantó rápidamente y se tapó de inmediato para evitar aire dentro del recipiente. Las muestras de agua fueron transportadas al laboratorio y conservadas a 10°C. Los análisis se realizaron en el laboratorio del departamento de Geología, Área de Hidrología de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Los registros de lluvias en cada mes y año de muestreo fueron aportados por cada estancia a los fines de evaluar cuáles resultaron los más lluviosos y secos. Esta característica es crucial para la reproducción de los anfibios.

3.3.4. Análisis estadístico

Con los datos de las variables ambientales se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). Para lo cual se utilizó el programa estadístico InfoStat (Di Renzo et al., 2017). Las variables cuantitativas fueron consideradas como continuas, mientras que variables cualitativas como ordinales.

3.4. Procedimientos de campo y laboratorio para el estudio de las especies

Los muestreos se realizaron de manera sistemática, una vez cada 15 días desde septiembre a marzo, coincidiendo con el periodo de reproducción de las especies en estudio y durante 4 años consecutivos (2014-2018).

Para los muestreos se utilizó la metodología de Relevamientos por Encuentros Visuales (Heyer et al., 1994), que consiste en recorridos por el borde de los cuerpos de agua para la observación, y captura de larvas, metamorfoseados y adultos. Una vez capturados los individuos se les determinó: clase de edad (recién metamorfoseado, juvenil o adulto), sexo, según los caracteres sexuales secundarios (saco vocal, almohadillas nupciales y vocalización), peso, determinado con balanza semi-analítica OHAUS GT 200-S (0,01g de precisión) y la longitud hocico cloaca (LHC), utilizando un calibre manual Vernier SometInox Extra (0.01 mm precisión). La extracción de sangre, se realizó por punción de la

vena angularis de acuerdo a la metodología de Nöller (1959), inmediatamente después de su captura fueron liberados en el sitio donde se los encontró.

3.4.1. Biomarcadores

Se determinaron las frecuencias de biomarcadores genotóxicos y citotóxicos de acuerdo a Guilherme et al., (2008). Los marcadores genotóxicos se utilizaron para estimar el daño genético en eritrocitos de sangre periférica mediante el registro de anomalías morfológicas a nivel del núcleo de estas células. En cuanto a los marcadores citotóxicos, las alteraciones en la dinámica hematológica o eritropoyesis generan células defectuosas en cuanto a su morfología, también asociada a contaminantes.

La fórmula leucocitaria se utilizó indirectamente como índice de estrés de los individuos expuesto a contaminantes (Davis et al., 2004).

3.4.1.1. Biomarcadores genotóxicos

La prueba de micronúcleos (Mn) es un test validado internacionalmente como bioensayo para evaluar genotoxicidad de sustancias con exposiciones agudas y crónicas.

Un total de 2000 eritrocitos se analizaron por individuo, utilizando microscopio Carl Zeiss trinocular Primo Star (Pack 5) con objetivo de 100X de inmersión en aceite y se tomaron fotografías con cámara digital Canon PowerShot G10 14,7 Megapíxeles con la utilización de software AxioVision 4.3

Los criterios para la identificación de Micronúcleos (Mn) fueron siguiendo lo propuesto por Schmid (1975) y Fenech (2000):

- * El diámetro del Mn por lo general varía desde 0,4 a 1,6 micras (1/3 a 1/16).
- * Los Mn deben estar separado del núcleo principal, debe haber una identificación clara del límite nuclear.
- * Los Mn no son refractivos permitiendo diferenciarse fácilmente de cualquier material extraño como basuras, manchas, etc.
- * Se tiñen de la misma intensidad que el núcleo principal.
- * Los Mn deben ser casi redondos.

* Los Mn deben estar incluidos en el citoplasma celular.

Las Anormalidades Nucleares Eritrocitarias (ANE) han sido clasificadas según los criterios de Silva Souza & Fontanetti (2006) y Pollo et al., (2012) como:

* Células con el núcleo con hendidura o escotados (notched nuclei). Los núcleos con profundidad apreciable, que no contenga material nuclear.

* Células con el núcleo brotado (nuclear buds). Los brotes fueron considerados como evaginaciones más grandes que los núcleos globulares donde se pueden observar más de uno.

* Células binucleadas o multinucleadas: la célula se presenta con dos núcleos de igual tamaño, forma y patrón de tinción, estos pueden tocarse pero no solaparse.

* Células con el núcleo globular: estas presentan una evaginación relativamente pequeña de la membrana nuclear, que contiene eucromatina.

La frecuencia de Micronúcleos (Mn) y Anormalidades Nucleares Eritrocitarias (ANE) fue calculada como:

$$\% \text{ Mn o ANE} = \frac{\text{número de células que contienen Mn o AN} \times 1000}{\text{número total de células contadas}}$$

En la Figura 5 se muestran los Micronúcleos (Mn) y Anormalidades Nucleares Eritrocitarias (ANE) de las especies estudiadas.

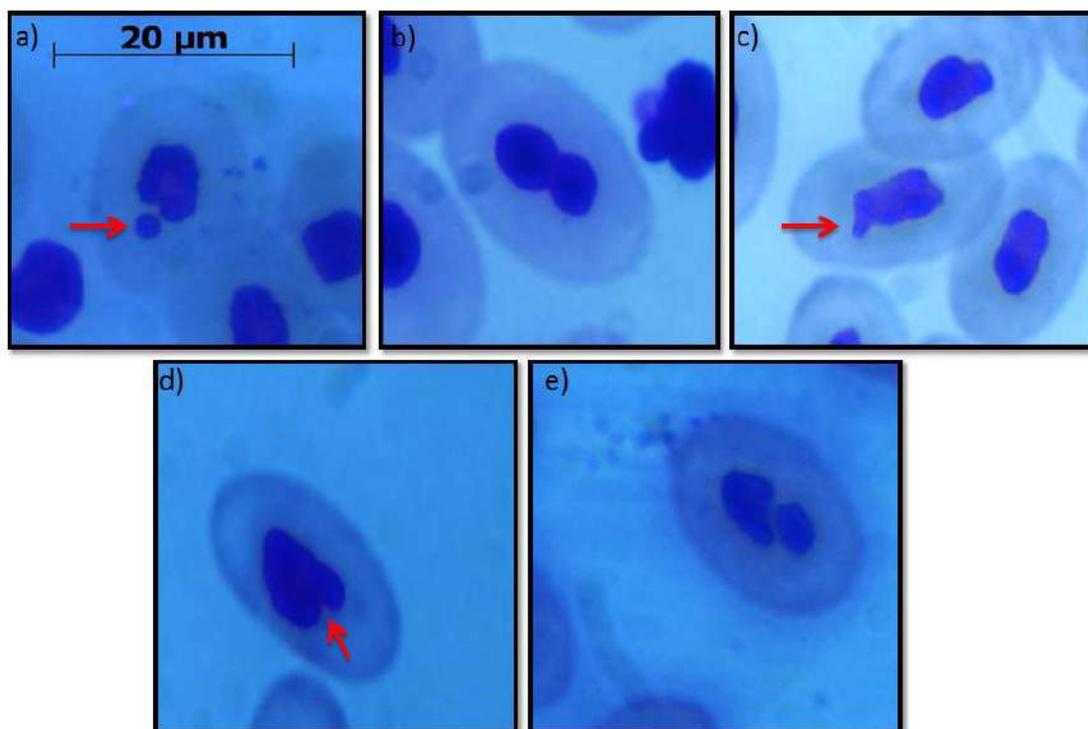


Figura 5. Micronúcleos (Mn) y Anormalidades Nucleares Eritrocitarias (ANE). a) Micronúcleo, b) Eritrocito con núcleo globular, c) Eritrocito con núcleo brotado, d) Eritrocito con núcleo escotado, e) Eritrocito con núcleo binucleado. Fotos: Zulma Salinas

3.4.1.2. Biomarcadores citotóxicos

Se calculó la frecuencia de amitosis (Figura 6a y b), eritrocitos en mitosis (Figura 6c), eritrocitos inmaduros (Figura 6d), anucleados (Figura 6e), como medida indirecta de la hematopoyesis, a través de la cantidad de eritroblastos (Barni et al., 2005; Guilherme et al., 2009). La distinción entre eritrocitos maduros (EM) y eritrocitos inmaduros (EI) se basó en los criterios establecidos por Hibiya (1982) y Smith (1990), considerando un citoplasma de color gris azulado y el núcleo más redondo y más grande en los EI que los EM.

En la Figura 6 se muestran los distintos biomarcadores citotóxicos.

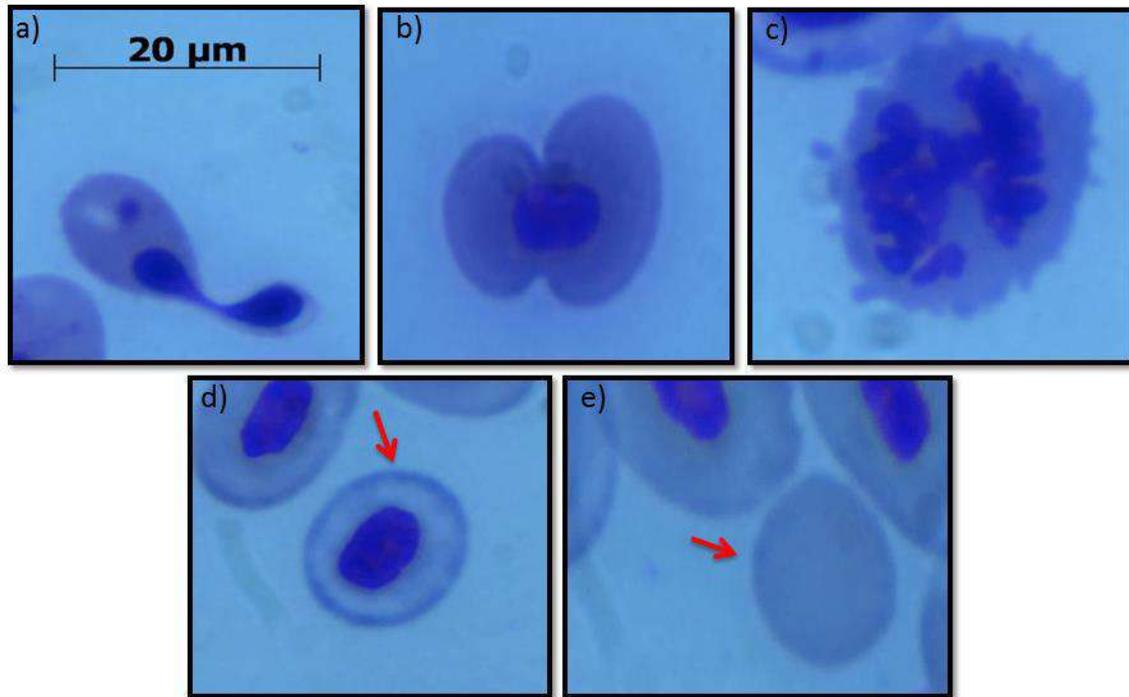


Figura 6. Eritrocito amitótico a-b), Célula en división c), Eritrocito inmaduro d), Eritrocito anucleado e). Fotos: Zulma Salinas

3.4.1.3. Fórmula leucocitaria

A partir de los extendidos se determinó la fórmula leucocitaria mediante microscopio Zeiss Primo StariLED en objetivo de 40X en base a la metodología de Davis et al., (2004) y la morfología de leucocitos en base a las características descritas por Varela & Sellares (1937a). Se determinaron la relación heterófilos/linfocitos (H/L), propuesta como una medida de los individuos en respuesta al estrés (Davis et al., 2008), para evaluar el grado de madurez leucocitario (García Espinosa et al., 1997).

3.4.2. Análisis estadístico

Cada individuo representó la unidad experimental, donde se calculó una frecuencia de la variable biológica. De este modo, se consideraron a cada individuo como réplica dentro de cada sitio. Se probó los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas con el test Kosmogorov-Smirnov y de Levene, respectivamente. Si los supuestos no se

cumplen, se considerará aplicar una distribución de Poisson y un modelo lineal generalizado con una prueba pos-hoc Di Rienzo, Guzman y Casanoves (DGC) para probar diferencia entre medias (Di Rienzo et al., 2017). Los análisis se realizaron con el paquete de datos del programa estadísticos Infostat/P versión 1.1 (Di Rienzo et al., 2017).

Las variables ambientales se analizaron con el Análisis de Componentes Principales (ACC) con su biplot. Se tomó las medias de las variables ambientales a las cuales se las transformó con $Y = \text{Log}(1+X)$ para normalizarlas. Variables con alta correlación se extrajeron del análisis, para lo cual se consideró un coeficiente de correlación superior a 0.9.

Para relacionar parámetros del agua (variables cuantitativas) con los biológicos en adultos de *Rhinella arenarum* y *Leptodactylus latrans*, se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA) y un gráfico triplot.

3.4.3. Anormalidades morfológicas

Se utilizó el término anormalidad morfológica, el cual incluye ambos tipos de anormalidades, traumáticas y de desarrollo, en lugar de malformación (Johnson et al., 2001; Peltzer et al., 2011). Se colectaron adultos que presentaron anormalidades morfológicas. Los individuos fueron transportados al laboratorio para su procesamiento. Los ejemplares fueron examinados para determinar el tipo de anomalías usando un protocolo estándar para su clasificación (Lanoo et al., 2008; Pelzer et al., 2008, 2011, 2013; Bionda et al., 2012; Babini et al., 2015).

Los individuos capturados fueron anestesiados con metanosulfonato de tricafina (MS - 222, Argent Chemical Laboratories, Redmond, WA). Se pesaron con la balanza semi-analítica OHAUS GT 200-S (0,01g de precisión) y las mediciones de la longitud hocico-cloaca (LHC) se tomaron con calibre manual Vernier SometInox Extra (0.01 mm precisión). Además, los individuos anormales fueron fotografiados con una Canon Power Shot G10 14,7 Megapixeles adaptada a un microscopio Zeiss Primo StariLED y las radiografías se tomaron utilizando ERESO.MF3, 70 Kv, 10 macon 15 segundos de exposición.

A partir del largo hocico cloaca (LHC) y el peso, se calculó la condición corporal (CC) de acuerdo a lo sugerido por Jakob et al., (1996) y Lüddecke (2002).

3.4.4. Trabajo experimental de ecotoxicología: Test AMPHITOX

Se realizó el estudio ecotoxicológico AMPHITOX (SA), utilizando las condiciones estandarizadas del test AMPHITOX: AMPHIAGU (96 horas de exposición), AMPHICORT (7 días de exposición) y AMPHICRO (14 días de exposición).

Para evitar el sacrificio de hembras y machos en la obtención de tres puestas, se decidió tomar un sitio de referencia (“Charca de las Brujas” UNRC) y esperar se reprodujeran los individuos de *R. arenarum* (especie con la que se realiza el experimento).

El día 4 de noviembre de 2017 los individuos comenzaron a realizar su canto nupcial en la Charca de las Brujas, por lo que se procedió a buscar las puestas de tres amplexos. En el laboratorio se examinaron los huevos fecundados en busca de malformaciones o mortalidad, a la vez que se determinó el estadio utilizando la tabla de Gosner (1960). Se acondicionó el laboratorio para que los huevos eclosionaran, depositándolos en cubetas con agua de clorada previamente y oxigenada para evitar su mortalidad.

El experimento comenzó el día 7 de noviembre de 2017 donde los embriones se encontraban en un estadio 20 de Gosner, y coincidiendo cuando las mismas comienzan a movilizarse y sus branquias son externas. Los embriones se colocaron en placas de Petri (10 individuos por cada recipiente), con el agua de cada uno de los sitios seleccionados (6 lagunas), presentando 2 réplicas por experimento, incluyendo el recipiente control donde se colocó Solución ANPHITOX de acuerdo al protocolo de Herkovitc & Pérez-Coll (1999).

Teniendo en cuenta que cualquier sustancia tóxica en la muestra de agua produce efectos en el desarrollo embrionario cuantificables tales como la mortalidad, malformaciones, y otros como la inhibición en el crecimiento, retraso en el desarrollo, alteración en el desarrollo celular, en el comportamiento, se registraron durante el experimento distintas respuestas biológicas (ends points).

Al final del experimento, se les determinó el longitud total (LT) y el peso, y se calculó la condición corporal (CC) de acuerdo a lo sugerido por Jakob et al., (1996) y Lüddecke (2002). Por último, se registró el porcentaje de supervivencia embrionaria y de

malformados a las 96 horas, 7 y 14 días, documentando los defectos morfológicos encontrados.

Conforme el protocolo, la solución para el experimento es la Holtfreter se trata de un agua dulce artificial compuesta por una solución salina y un buffer. Composición de la solución salina madre: ClNa 36g/L; ClK 0,5g/L; Cl₂Ca 1g/L. La Composición de la solución buffer madre: NaHCO₃ 0,2g/L. Siendo la solución de uso recomendado al 10%.

Las concentraciones en cada placa fueron de 100%, 75%, 50% y 25% para cada sitio de muestreo, con su réplica correspondiente. Y por otro lado, la solución Amphitox al 100% en el control, también con su réplica.

Se controló regularmente el pH durante el desarrollo del experimento, principalmente cuando se realizaba el recambio de las soluciones.

Las placas debían encontrarse en un ambiente a temperatura constante a lo largo del experimento. Se utilizaron filtros para garantizar la eliminación de cualquier partícula que contamine la muestra. La disposición de las placas fue espaciada y con la suficiente luz como para que las larvas pudieran desarrollarse normalmente a través del fotoperiodo.

Se tuvo en cuenta la morfología normal correspondiente a cada estadio. Se descartaron aquellos embriones demorados, asimétricos, deformes, dañados o aquellos con alteraciones en la pigmentación. La manipulación de los embriones puede hacerse con una pipeta de vidrio con una perita de goma para hacer succión o una de plástico.

A partir del estadio 23, las larvas, fueron alimentadas con diente de león (*Taraxacum officinalis*) hervido y enfriado. Dicha alimentación provenía de lugares no fumigados o contaminados, y se las suministró “*Ad libitum*”, dos horas antes de cambiar la solución.

Para el análisis estadístico se realizó una prueba de Kruskal Wallis con el programa de estadística Infostat (Di renzo et al., 2017) para comparar la longitud total de las larvas de todos los tratamientos al final del experimento.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de los sitios de muestreo

4.1.1. Gradiente de perturbación:

La Tabla 4b a continuación se representa las ponderaciones de cada una de las variables para la estación de primavera.

Tabla 4b. Ponderación de las variables en función a la perturbación para cada uno de los sitios correspondiente a primavera (*Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM= Laguna Vaca Muerta, LagG= Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL= Laguna Brazo Largo, LagY= Laguna Yuyal; Color amarillo=perturbación a nivel de cobertura; Color verde=perturbación a nivel de agricultura; Color celeste=perturbación a nivel de disturbios; Color violeta=perturbación a nivel de conectividad; Color turquesa=perturbación a nivel de hidropериodo*).

	LagS	LagVM	LagG	LagC	LagBL	LagY
Estratos de vegetación en márgenes	2	4	2	1	4	1
Vegetación en márgenes	0	2	3	2	3	0
Estratos de vegetación interna	2	4	1	1	4	1
Vegetación interna	2	3	3	2	3	0
Distancia al cultivo	0	2	1	2	3	0
Tipo de cultivo	0	2	1	2	2	0
Rotación	0	2	1	1	2	0
Pastizal natural	0	1	1	0	1	0
Presencia de ganado	0	1	1	0	2	0
Pisoteo	0	0	1	0	2	0
Frecuencia de disturbios	1	4	3	4	4	0
Conexión entre cuerpos de agua	0	0	1	1	0	1

Disponibilidad de agua	1	1	1	0	1	0
Total	8	26	20	16	31	3

En función de la tabla 4, se realizó el siguiente gradiente de perturbación en los cuerpos de agua:

LagBL>LagVM>LagG>LagC>LagS>LagY

Luego, para realizar un juicio a los indicadores de impacto, a través de los promedios de las características de perturbaciones se clasificó a los cuerpos de agua de la siguiente manera:

- LagBL: Alteración fuerte, calidad mala (X=5.16).
- LagVM: Inicio de alteraciones importantes (X=4.33).
- LagG y LagC: Ligeras perturbaciones, calidad buena (X=3.33; X=2.66).
- LagS y LagY: Sin alteraciones, calidad buena (X=1.33; X=0.5).

La Tabla 5 a continuación se representa las ponderaciones de cada una de las variables para la estación de verano.

Tabla 5. Ponderación de las variables en función a la perturbación para cada uno de los sitios correspondiente a verano (*Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM= Laguna Vaca Muerta, LagG= Laguna Gigante, LagC= Laguna Canaleta, LagBL= Laguna Brazo Largo, LagY= Laguna Yuyal; Color amarillo=perturbación a nivel de cobertura; Color verde=perturbación a nivel de agricultura; Color celeste=perturbación a nivel de disturbios; Color violeta=perturbación a nivel de conectividad; Color turquesa=perturbación a nivel de hidropериodo*).

	LagS	LagVM	LagG	LagC	LagBL	LagY
Estratos de vegetación en márgenes	1	3	2	1	2	1
Vegetación en márgenes	0	1	2	1	3	0
Estratos de vegetación interna	1	3	2	1	3	1
Vegetación	2	2	2	2	2	0

interna						
Distancia al cultivo	1	3	2	2	3	0
Tipo de cultivo	1	2	2	2	2	0
Rotación	0	2	1	2	2	0
Pastizal natural	0	0	0	0	0	0
Presencia de ganado	0	2	2	0	2	0
Pisoteo	0	0	1	0	2	0
Frecuencia de disturbios	3	4	3	4	4	0
Conexión entre cuerpos de agua	0	0	1	1	0	1
Disponibilidad de agua	1	1	1	1	1	1
Total	10	23	21	17	23	4

En función de la Tabla 5, se realizó el siguiente gradiente de perturbación de los cuerpos de agua:

LagBL y LagVM>LagG>LagC>LagS>LagY

Luego, para realizar un juicio a los indicadores de impacto, a través de los promedios de las características de perturbaciones se clasificó a los cuerpos de agua de la siguiente manera:

- LagBL y LagVM: Alteración fuerte, calidad mala (X=3.83).
- LagG: Inicio de alteraciones importantes (X=3.5).
- LagC: Ligeras perturbaciones, calidad buena (X=2.83)
- LagS y LagY: Sin alteraciones, calidad buena (X=1.66; X=0.66).

4.1.2. Variables de morfometría de las lagunas

En la construcción de los mapas se consideraron los lotes con sus respectivos tipos de cultivos y manejo agrícola-ganadero, área y perímetros de las lagunas en las estaciones del

año primavera-verano en los períodos de muestreos 2016-2017. En la Figura 7 se esquematizó la Estancia Altos Verdes donde se localizaron las lagunas: LagVM, ubicada al noroeste, y LagS, ubicada al este de la estancia. Ambas presentan diferentes formas y tamaños en cada una de las estaciones. LagVM presenta una forma redondeada con un perímetro de 1.979 m en primavera ocupando un área de 281.879 m² y 2.684 m durante el verano con un área de 355.614 m². Mientras, que LagS presenta un perímetro de 2.555 m y un área de 207.690 m² durante la primavera; y en verano, 5.008 m de perímetro y 506.961 m². Se observa además en el esquema, los lotes destinados a producción orgánica y producción convencional. También se detalla los tipos de cultivos realizados en cada uno de los lotes. De acuerdo a la pendiente Noroeste-Sureste proporcionada por las hojas topográficas del IGN, LagVM presenta una altura sobre el nivel del mar de 246 msnm, mientras que LagS 240 msnm. Esto indicaría que por escorrentía muchas de las sustancias se podrían desplazar de una laguna a la otra.

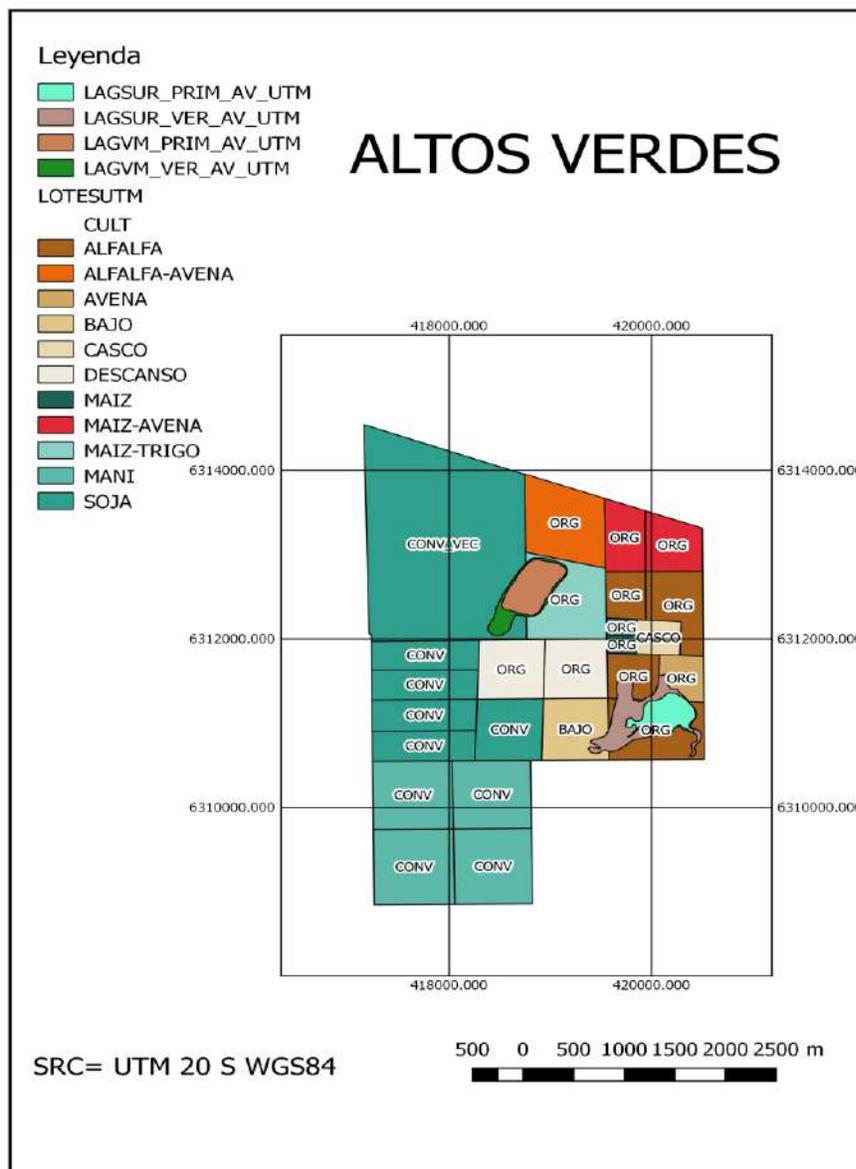


Figura 7. Esquema de la Estancia Altos Verdes (*Referencias: CONV=Convencional, VEC=Vecino, ORG=Orgánico, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca muerta, PRIM=Primavera, VER=Verano*).

En la Figura 8, se observa en el esquema, que los lotes bajo manejo convencional se encuentran al norte de la estancia Las Gaviotas, mientras que los orgánicos hacia el sur. Con respecto al tipo de cultivo, existe una variedad, sujetos a estrictas rotaciones que varían de año en año. Las pasturas en cambio, son destinadas al ganado, en este caso los lotes presentan un manejo orgánico. La laguna ubicada al este de la estancia, LagG, durante la

primavera presenta un perímetro de 6.114 m y un área de 515.326 m². Mientras que durante el verano amplía considerablemente su tamaño con un perímetro de 6.690 m y un área de 746.446 m², incluso entrando en contacto con otra laguna más al norte, la cual es compartida con la estancia vecina. LagC, ubicada al noreste de la estancia, presenta en primavera un perímetro de 1.179 m y un área de 10.775 m². Mientras que en verano, su perímetro es de 1.048 m y un área de 45.241 m².

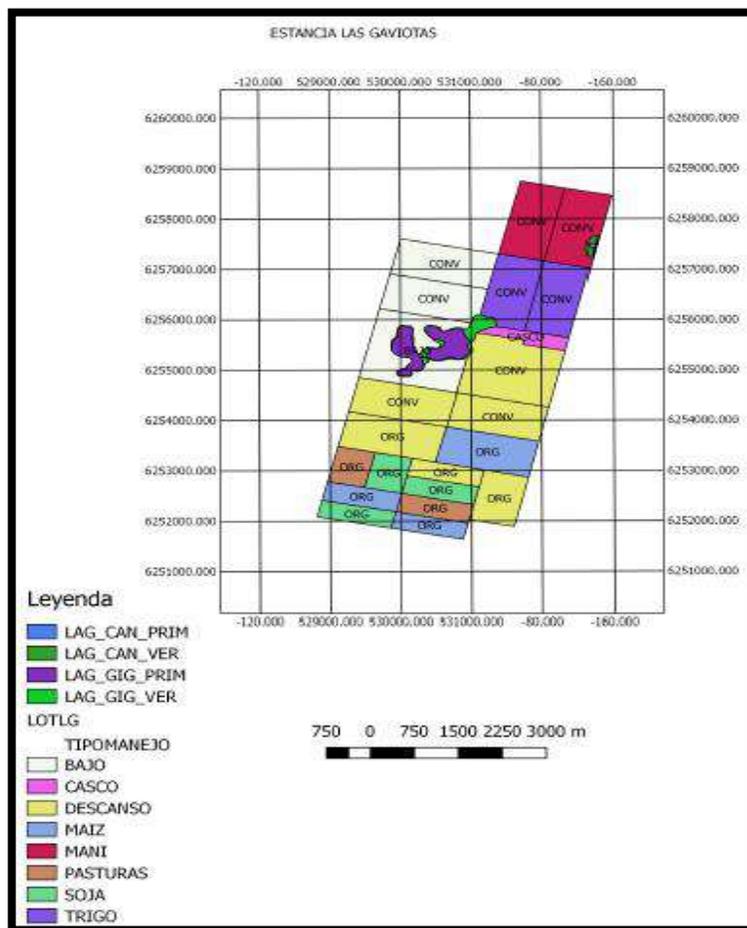


Figura 8. Esquema de la Estancia Las Gaviotas (*Referencias: CONV=Convencional, ORG=Orgánico, LagC=Laguna Canaleta, LagG=Laguna Gigante, PRIM=Primavera, VER=Verano*).

La Figura 9 corresponde a la Estancia Las Dos Hermanas. Se observa que su único manejo es orgánico y las pasturas siguen un patrón estricto de rotación de cultivo, ganado y descanso del suelo. Hacia el sur de la estancia se observa la laguna Las Tunas que es una reserva provincial, con lotes que nunca han sido destinados a la agricultura. Allí se

encuentra uno de los sitios de estudio: LagY. Tiene un perímetro de 2.751 m y un área de 116.608 m². Mientras que la otra laguna LagBL se ubica al noreste de la estancia inmersa en lotes bajo manejo agrícola. Una parte de ella bajo manejo orgánico, y la otra, bajo manejo convencional debido a que se comparte con campos vecinos. Tiene un perímetro de 3.162 m y un área de 577.898 m² en primavera, y en verano, un perímetro de 4.140 m y un área de 823.432 m².

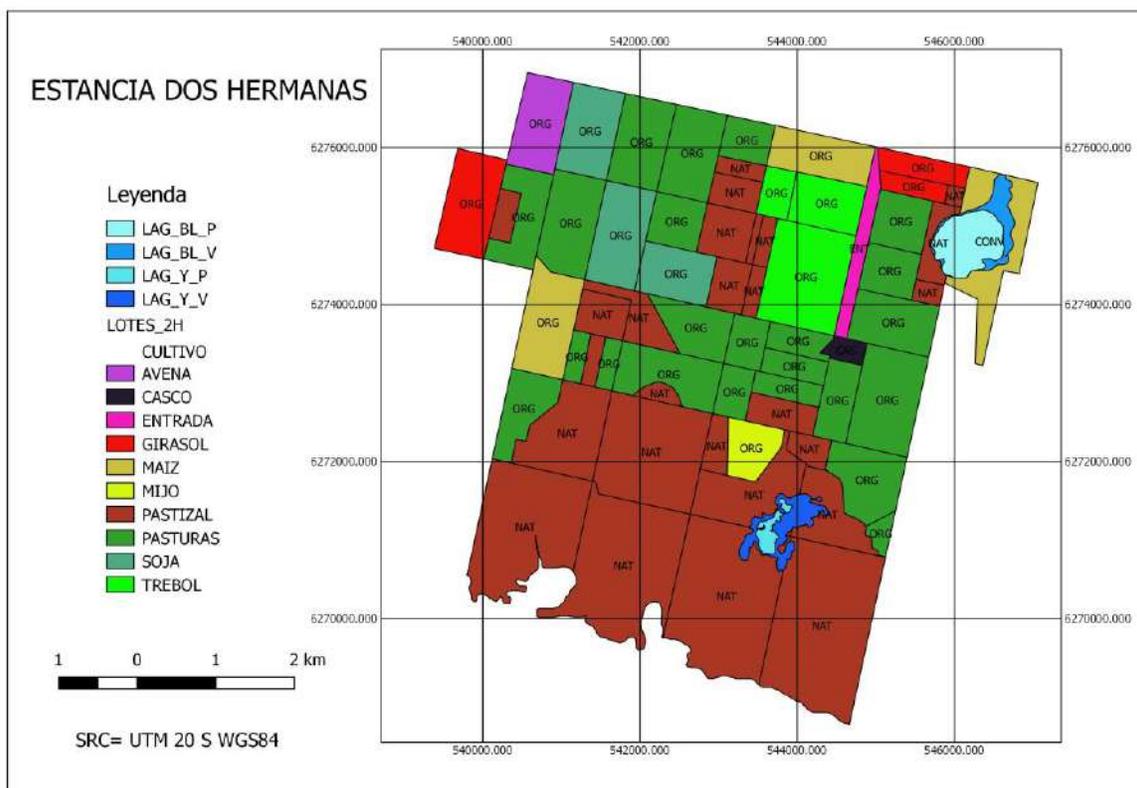


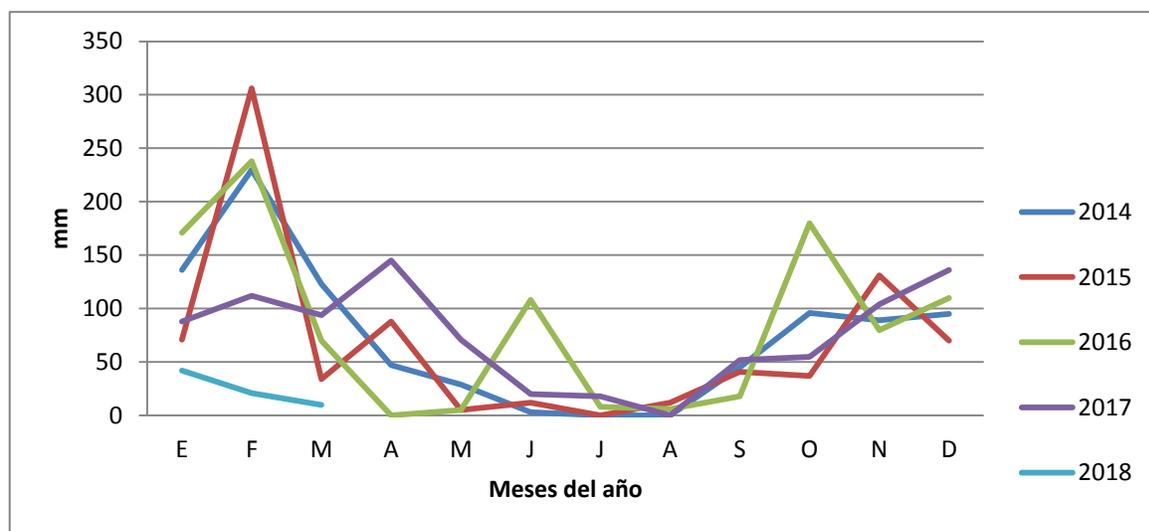
Figura 9. Esquema de la Estancia Las Dos Hermanas (Referencias: *ORG*=Orgánico, *NAT*=Natural, *LagBL*=Laguna Brazo largo, *LagY*=Laguna Yuyal, *P*=Primavera, *V*=Verano, *ENT*=Entrada, *CAS*=Casco).

4.1.3. Variables ambientales de calidad de agua

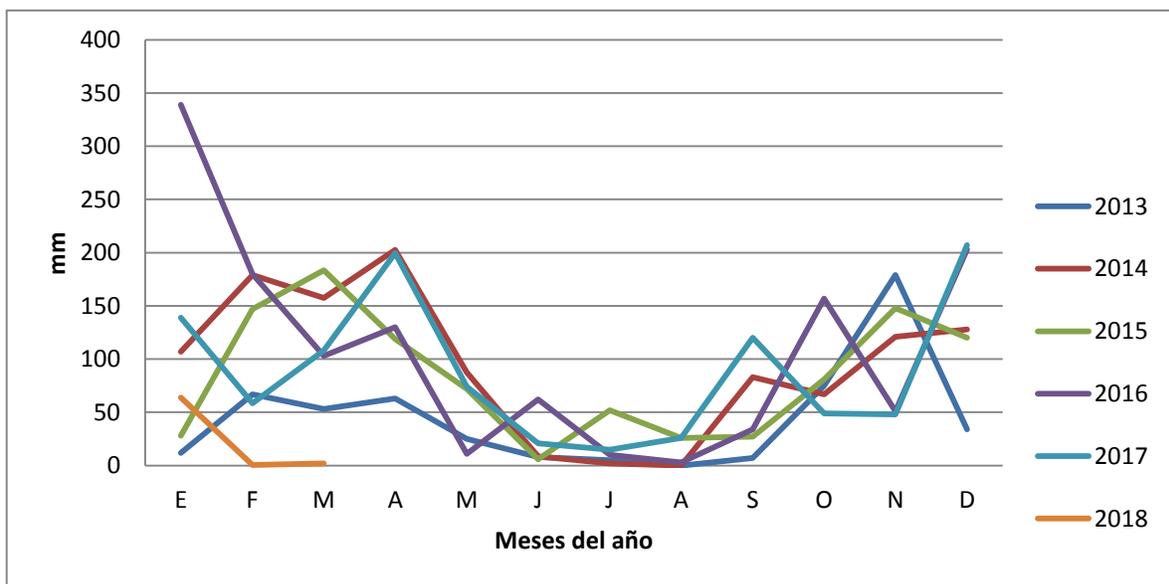
Las precipitaciones registradas en las áreas de muestreo se presentan en la Figura 10. Se observan pequeñas variaciones en la misma asociada a aportes generados a las lagunas de estudio, y por ende, condiciones propicias para la reproducción de los anfibios anuros.

Los picos máximos de precipitación en todos los sitios, se centran, en general, en el mes de febrero. En la estancia Altos Verdes el año de mayor aporte de lluvias fue durante 2015 con 300 mm aproximadamente. En Las Gaviotas, en cambio, los picos fueron durante 2014 y 2016 llegando a los 175 mm para ese mismo mes, sin embargo, el pico máximo en el año fue en el mes de enero de 2016. La Estancia Las Dos Hermanas presentó dos picos de precipitaciones durante el 2014, en febrero con 400 mm y el otro en abril alcanzando los 250 mm. Cabe aclarar, que durante los años de muestreo se observan cambios en el régimen de lluvias debido al fenómeno del Niño a Niña. Por ejemplo, en los últimos años, se observan abundantes precipitaciones en junio. Algo inusual para este mes.

a)



b)



c)

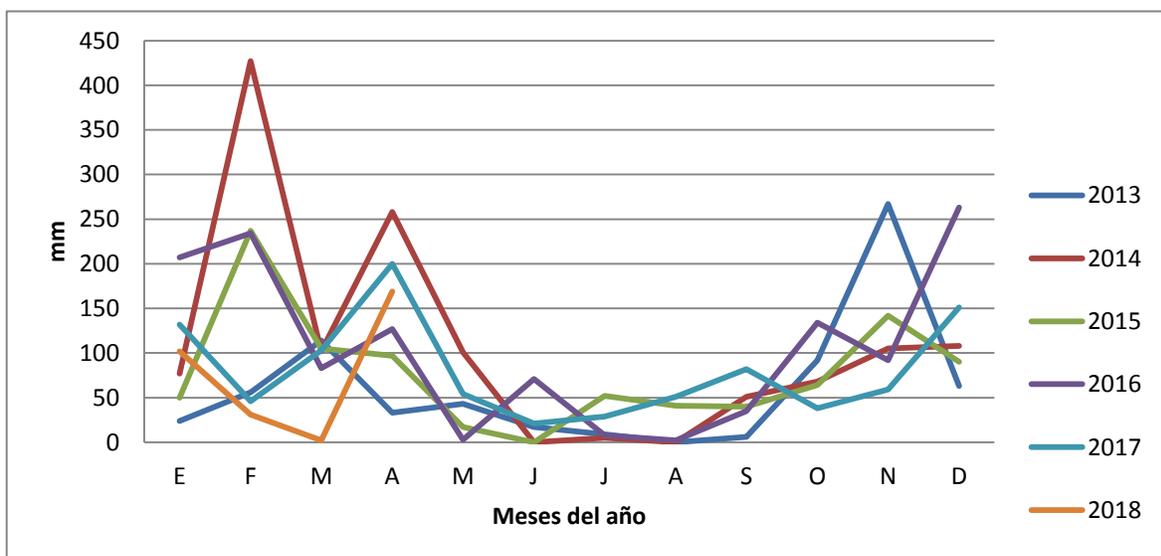


Figura 10. Lluvia mensual expresada en milímetros en cada una de las estancias. a) Estancia Altos verdes. b) Estancias Las Gaviotas. c) Estancia Las Dos Hermanas.

En las Tablas 6 y 7 están representadas las variables ambientales registradas en el campo, mientras que en las Tablas 8 y 9, las variables físico-químicas aportadas por el departamento de Geología. La temperatura del agua fue mayor en LagBL y LagY. Los valores de pH en primavera fueron mayores en LagG. Los sólidos disueltos totales,

salinidad y conductividad fueron mayores en LagC. Por último, el oxígeno fue mayor para LagS, mientras que LagBL presentó el menor valor.

Tabla 6. Variables ambientales de los sitios estudiados en primavera (*Referencias: Temp.=Temperatura, SDT=Sólidos disueltos totales, Sal=Salinidad, Cond=Conductividad, Ox= Oxígeno, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal*).

	Temp. Agua (°C)	Temp. Aire (°C)	pH	SDT (ppm)	Sal (ppm)	Cond (µS)	Ox (%)	Ox (ppm)
LagS	21.92±5.62	20.45±2.80	9.39±0.50	2.72±0.58	1.95±0.46	3.84±0.81	106.56±76.07	8.57±6.86
LagVM	21.81±6.34	22.60±5.50	9.75±0.48	55.97±1.84	38.24±1.23	79.71±0.84	72.55±5.79	5.85±2.99
LagG	23.82±2.97	23.36±3.51	9.96±0.38	3.04±0.93	2.15±0.84	4.46±1.23	121.89±20.42	5.55±0.12
LagC	22.9±4.78	21.77±3.60	9.79±0.49	614.28±0.19	543.10±205.5	1068.82±389.5	81.575±32.43	7.62±2.05
LagBL	24.75±4.39	18.91±3.49	9.40±0.81	3.73±1.36	2.79±1.13	5.28±1.91	51.37±29.01	3.60±2.12
LagY	24.1±0.71	21.57±0.70	8.77±0.35	2.10±0.14	536.07±55.15	1049.19±530.33	67.75±4.24	5.41±0.17

La temperatura del agua en verano fue mayor en LagS. Los valores de pH fueron mayores en LagVM. Los sólidos disueltos totales, salinidad y conductividad fueron mayores en LagY. Por último, el oxígeno fue mayor para LagBL, mientras que LagY presentó el menor valor (Tabla 6).

Tabla 7. Variables ambientales de los sitios estudiados en verano (*Referencias: Temp.=Temperatura, SDT=Sólidos disueltos totales, Sal=Salinidad, Cond=Conductividad, Ox= Oxígeno, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal*).

	Temp. Agua (°C)	Temp. Aire (°C)	pH	SDT (ppm)	Sal (ppm)	Cond (µS)	Ox (%)	Ox (ppm)
LagS	27.86±3.45	25.15±5.73	9.20±0.54	2.19±0.95	348.90±0.95	684.66±482.0	54.31±16.35	6.70±4.63
LagVM	26.54±2.26	21.47±2.25	10.02±0.41	2.13±0.61	1.41±1.13	40.79±98.8	87.93±41.07	6.60±2.39
LagG	25.258±9.16	26.1±9.61	9.36±1.04	111.42±266.0	77.41±184	157.50±375	60.2±60.5	9.75±11.66
LagC	27.73±9.87	24.87±9.67	9.43±1.25	196.86±362.1	246.06±338.6	512.25±704.5	74.37±24.36	6.06±0.78
LagBL	24.57±6.66	25.62±7.34	9.21±0.24	2.39±1.68	1.57±1.29	3.37±0.23	128.7±73.45	11.16±6.03
LagY	24.4±6.92	23.4±6.50	7.85±0.35	322.18±453.7	633.00±332.3	1405.50±710.6	30.3±27.86	2.83±2.72

En primavera, LagBL presentó los mayores valores para CO_3 , HCO_3 , SO_4^- y Na^+ . Los valores de Cl^- fueron mayores en LagG. Valores de K^+ fueron mayores para LagVM y LagG. LagY presentó los valores mayores para Ca^{++} . LagC y LagY mayores valores de NO_3^- . LagVM y LagS presentaron los mayores valores de F- y $\text{As}^{+3/+5}$. Por último, los valores de PO_4^{-3} fueron mayores en LagC y menores en LagS (Tabla 8).

Tabla 8. Variables físico-químicas del agua para la estación de primavera (*Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal*).

	CO ₃ m/l	HCO ₃ mg/l	SO ₄ ⁼ mg/l	Cl- mg/l	Na ⁺ mg/l	K ⁺ mg/l	Ca ⁺⁺ mg/l	Mg ⁺⁺ mg/l	NO ₃ ⁻ mg/l	NO ₂ m/l	F- mg/l	As ^{+3/+5} mg/l	PO ₄ ⁻³ mg/l
LagS	45.45±0.0	1450.65±0.0	183.90±0.0	145.70±0.0	891.80±0.0	42.85±0.0	24.40±0.0	13.65±0.0	0.00	0.00	6.30±0.0	110.00±0.0	1.50±0.0
LagVM	82.40±0.0	1163.75±0.0	85.25±0.0	100.00±0.0	566.25±0.0	49.55±0.0	13.60±0.0	8.30±0.0	0.00	0.00	8.20±0.0	80.00±0.0	2.00±0.0
LagG	23.43±44.54	1234.60±1253.3	131.73±38.39	277.13±210.08	806.7±776.4	49.43±28.84	14.30±7.35	15.26±12.09	0.6±1.27	0.00	2.5±2.40	17.50±21.2	3.13±1.1
LagC	20.20±42.85	783.83±14.14	108.66±73.32	72.40±36.34	392.63±188	48.60±7.77	16±2.26	9.43±2.05	1.13±2.4	0.00	2.6±1.41	11.50±5.65	7.2±5.58
LagBL	140.6±149.1	2121.66±1916.2	209.46±117.6	239.06±157.6	1102.16±597	43.16±30.7	13.06±6.78	6.12±4.71	0.73±1.5	0.00	6.93±1.8	90±21.21	5.70±4.7
LagY	3.00±0.0	484.40±0.0	114.10±0.0	102.90±0.0	364.00±0.0	33.55±0.0	32.00±0.0	17.05±0.0	0.90±0.0	0.00	0.10±0.0	2.00±0.0	3.65±0.0

En verano, LagBL presentó los mayores valores para CO_3 , HCO_3 y Na^+ . Los valores de Cl^- y SO_4^- fueron mayores en LagG. Valores de K^+ fueron mayores para LagS. Mientras que LagY y LagC presentó los valores mayores para Ca^{++} . LagC y LagBL presentaron mayores valores de NO_3^- . LagS presentó los mayores valores de F- y $\text{As}^{+3/+5}$. Mientras que PO_4^3 presentó valores elevados en LagBL con respecto a los otros sitios. Seguido de LagVM (Tabla 9).

Tabla 9. Variables físico-químicas del agua para la estación de verano (*Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal*).

	CO ₃ mg/l	HCO ₃ mg/l	SO ₄ ⁼ mg/l	Cl ⁻ mg/l	Na ⁺ mg/l	K ⁺ mg/l	Ca ⁺⁺ mg/l	Mg ⁺⁺ mg/l	NO ₃ mg/l	NO ₂ mg/l	F ⁻ mg/l	As ^{+3/+5} mg/l	PO ₄ ³ mg/l
LagS	87.26±29.56	1822.50±262.9	183.86±0.002	127.63±12.77	869.60±15.7	90.66±33.8	13.86±7.45	5.53±5.74	0.00	0.00	7.30±0.70	111.00±0.70	11.60±0.14
LagVM	147.9±46.31	1290.8±89.89	153.96±48.58	127.63±19.53	725.66±113	42.40±5.07	11.53±1.46	8.63±0.23	0.00	0.00	5.83±1.67	42.40±26.6	12.00±7.07
LagG	269.7±174.1	900±236.6	272.80±99.75	519.40±171.3	546±184.3	36.70±9.0	11.20±2.19	6.50±6.19	0.00±0.4	0.00	2.50±0.0	13.50±2.82	2.60±0.37
LagC	50.90±21.7	626.25±111.4	94.65±9.90	54.30±12.79	278.57±80.6	66.22±12.4	32.20±11.4	6.47±2.09	1.50±0.26	0.00	3.80±0.84	7.85±2.58	3.22±2.81
LagBL	197.16±40.0	1913.2±0.147.4	240.50±21.94	228.56±30.61	1081.2±14.8	55.50±8.72	12.26±0.56	6.03±0.06	1.33±0.42	0.00	3.86±2.17	58.00±22.62	23.30±12.44
LagY	0.00±0.0	515.00±21.63	70.80±30.61	192.85±63.60	243.2±85.41	33.5±0.03	32.00±1.69	14.65±0.6	0.00	0.00	2.35±1.59	2.50±0.35	4.00±0.25

Se determinó una clasificación geoquímica en función de la dureza y salinidad en función a los sitios estudiados (Tabla 10).

Tabla 10. Clasificación del agua de los sitios muestreados (*Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal*).

Sitios	Por salinidad	Por dureza	Clasificación Geoquímica
LagS	Salada	Algo dura	Bicarbonatada Sódica
LagVM	Salobre	Algo dura	Bicarbonatada sódica
LagG	Salobre	Blanda	Bicarbonatada-clorurada sódica
LagC	Dulce	Dura	Bicarbonatada sódica
LagBL	Salada	Algo dura	Bicarbonatada Sódica
LagY	Dulce	Algo dura	Bicarbonatada Sódica

4.1.4. Relación entre variables ambientales de calidad de agua con las lagunas

Para construir el gráfico de ACP se consideraron los promedios de las variables ambientales registradas en los tres años de muestreo. En la Figura 11 en primavera, se observa que los componentes principales 1 y 2 explican el 94% de variabilidad de los datos. La variable CP1 separa los sitios LagC y LagY de los sitios LagVM, LagS, LagG y LagBL. Las variables de mayor peso positivo para CP1 son salinidad (Sal), conductividad (Cond) y turbidez (T), y se asocian a las lagunas LagY y LagC. Las variables de mayor peso negativo para CP1 son los bicarbonatos (HCO_3) y el sodio (Na^+), los cuales se asocian a las restantes lagunas (Tabla 11).

La variable CP2 separa los sitios LagS y LagY de los sitios LagBL, LagVM, LagG y LagC. Las variables de mayor peso positivo para CP2 son sólidos disueltos totales (SDT), potasio (K^+) y pH, y se asocian a LagBL, LagVM, LagC y LagG. Por otra parte, el calcio (Ca^{++}) fue la variable con mayor peso negativo para CP2, y está asociada a los sitios LagY y LagS (Tabla 11).

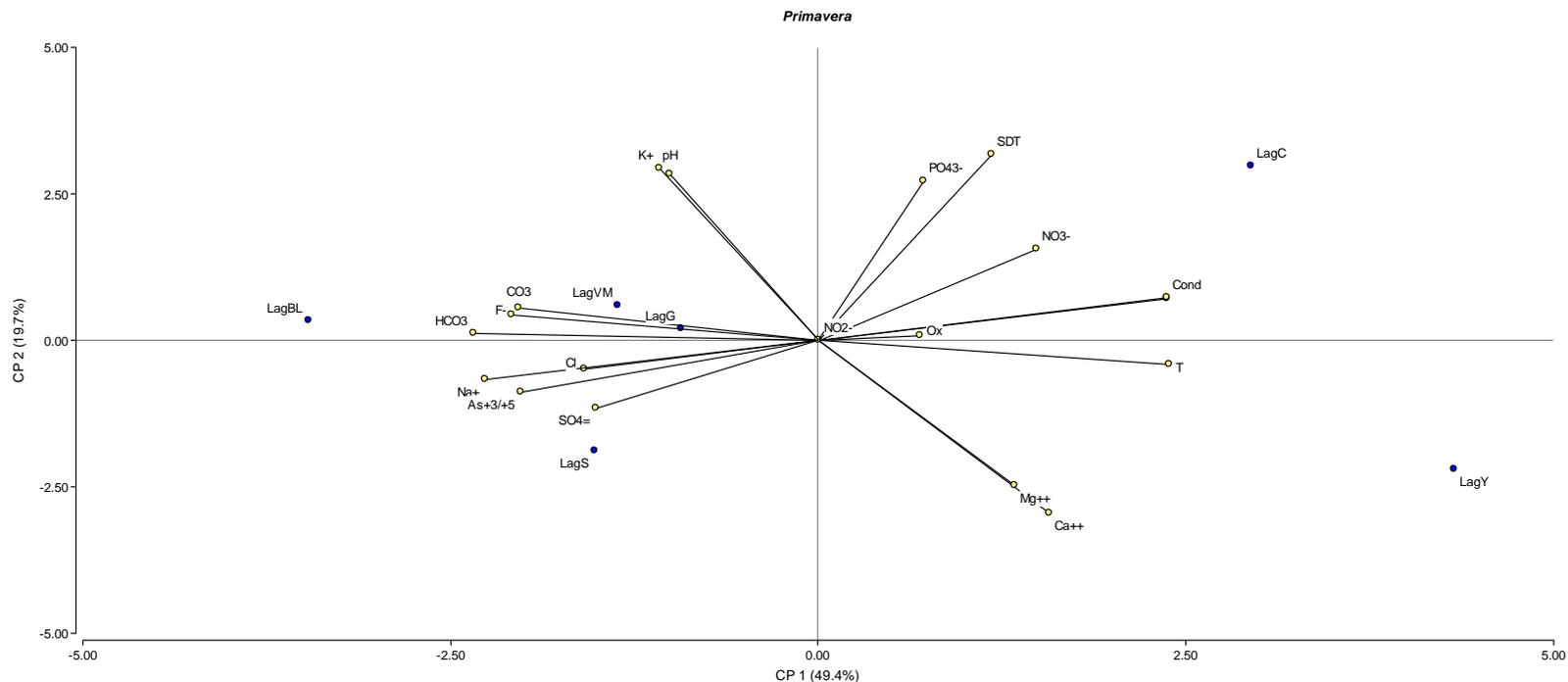


Figura 11. Gráfico de análisis de componentes principales para la estación de primavera (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal, CO_3 : Carbonato; HCO_3 : Bicarbonatos; SO_4 : Sulfatos; Cl^- : Cloruros; Na^+ : ión sodio; K^+ : ión potasio; Ca^{++} : ión calcio; Mg^{++} : ión magnesio; NO_3^- : Nitrato; NO_2^- : Nitrito; F^- : Flúor; $As^{3+/5}$: Arsénico; PO_4^{3-} : Fosfatos; SDT: Sólidos Disueltos Totales; Sal: Salinidad; Ox: Oxígeno; T: Turbidez).

Tabla 11. Pesos de las variables ambientales y físicoquímicas sobre los componentes PC1 y PC2 (Referencias: CO_3 : Carbonato; HCO_3 : Bicarbonatos; SO_4 : Sulfatos; Cl^- : Cloruros; Na^+ : ión sodio; K^+ : ión potasio; Ca^{++} : ión calcio; Mg^{++} : ión magnesio; NO_3^- : Nitrato; NO_2^- : Nitrito; F^- : Flúor; $As^{+3/+5}$: Arsénico; PO_4^{3-} : Fosfatos; SDT: Sólidos Disueltos Totales; Sal: Salinidad; Cond: Conductividad; Ox: Oxígeno T: Turbidez).

VARIABLES	CP1	CP2
CO_3	-0.81	0.14
HCO_3	-0.93	0.03
SO_4	-0.60	-0.29
Cl^-	-0.63	-0.12
Na^+	-0.90	-0.17
K^+	-0.43	0.74
Ca^{++}	0.63	-0.74
Mg^{++}	0.53	-0.63
NO_3^-	0.59	0.39
NO_2^-	0.00	0.00
F^-	-0.83	0.11
$As^{+3/+5}$	-0.81	-0.22
PO_4^{3-}	0.29	0.69
pH	-0.40	0.72
SDT	0.47	0.80
Sal	0.95	0.18
Cond	0.95	0.18
Ox	0.28	0.02
T	0.95	-0.10

En el gráfico del análisis de componentes principales (ACP) para verano (Figura 12), se observa que los componentes principales 1 y 2 explican más del 98% de variabilidad los datos. La variable CP1 separó los sitios LagC y LagY de los sitios LagVM, LagS, LagG y LagBL. Las variables de mayor peso positivo para CP1 son los sólidos disueltos totales (SDT) y calcio (Ca^{++}), y se asocian a los sitios LagC y LagY. La variable de mayor peso negativo para CP1 es el oxígeno (Ox) y se asocia a las lagunas LgG y LagBL (Tabla 12).

La variable CP2 separó los sitios LagS, LagC y LagVM de los restantes sitios. La variable de mayor peso positivo para CP2 son los cloruros (Cl^-), y se asocian con LagG. Por último, el flúor (F^-) y potasio (K^+) fueron las variables que mejor explican LagS y LagVM (Tabla 12).

En ambas estaciones, es importante destacar que LagY resultó la laguna que más se separó de las restantes (Figura 16).

*Ecotoxicología de anuros asociados a diferentes manejos agrícolas en Córdoba.
Resultados- Zulma A. Salinas*

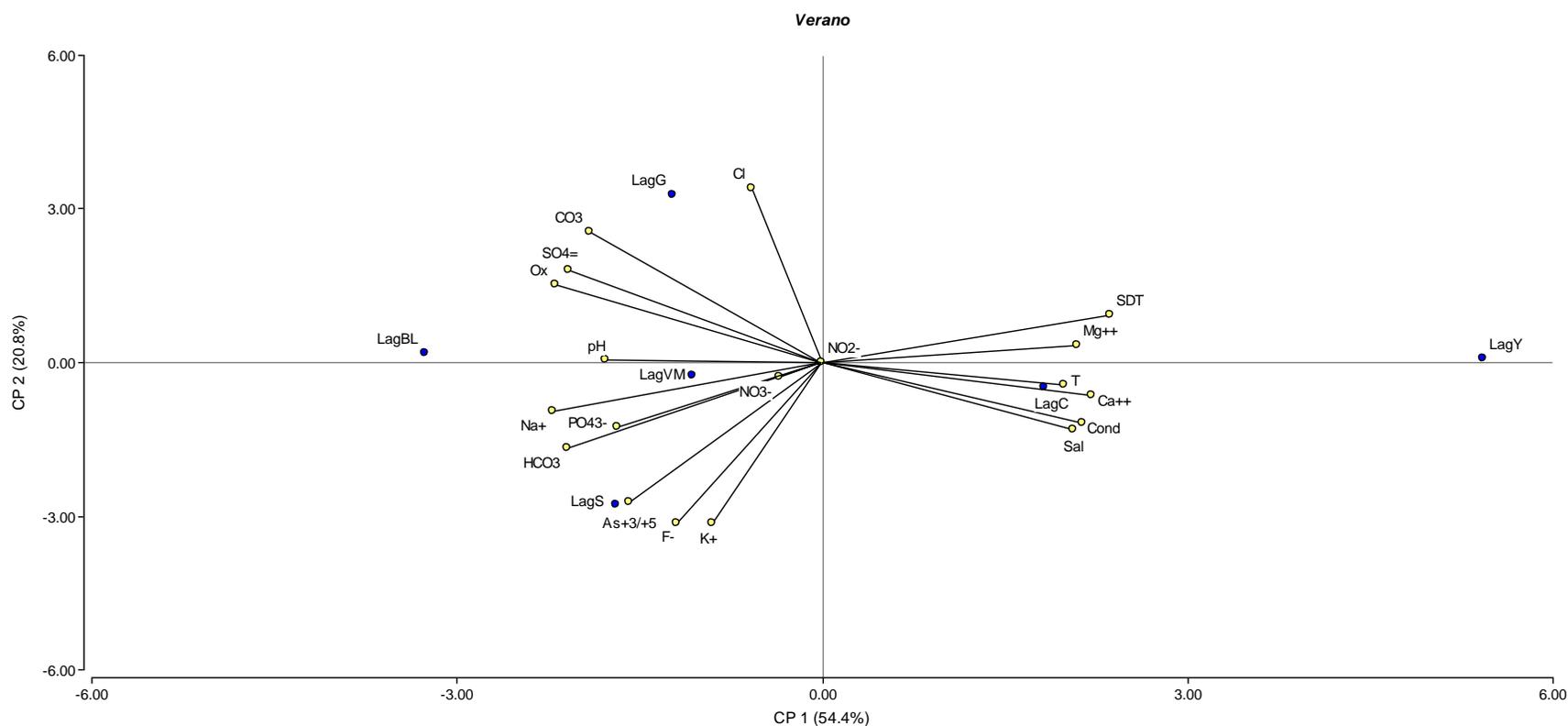


Figura 12. Gráfico de análisis de componentes principales para la estación de verano (*Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal, CO₃:Carbonato; HCO₃:Bicarbonatos; SO₄=: Sulfatos; Cl⁻: Cloruros; Na⁺: ión sodio; K⁺: ión potasio; Ca⁺⁺: ión calcio; Mg⁺⁺: ión magnesio; NO₃⁻: Nitrato; NO₂⁻: Nitrito; F⁻: Flúor; As^{+3/+5}: Arsénico; PO₄³⁻: Fosfatos; SDT: Sólidos Disueltos Totales; Sal: Salinidad; Ox: Oxígeno; T: Turbidez).*

Tabla 12. Pesos de las variables ambientales y físicoquímicas sobre los componentes PC1 y PC2 (Referencias: CO_3 : Carbonato; HCO_3 : Bicarbonatos; $SO_4=$: Sulfatos; Cl^- : Cloruros; Na^+ : ión sodio; K^+ : ión potasio; Ca^{++} : ión calcio; Mg^{++} : ión magnesio; NO_3^- : Nitrato; NO_2^- : Nitrito; F^- : Flúor; $As^{+3/+5}$: Arsénico; PO_4^{3-} : Fosfatos; SDT: Sólidos Disueltos Totales; Sal: Salinidad; Cond: Conductividad; Ox: Oxígeno; T: Turbidez).

VARIABLES	CP1	CP2
CO_3	-0.77	0.63
HCO_3	-0.84	-0.41
$SO_4=$	-0.84	0.44
Cl^-	-0.23	0.84
Na^+	-0.89	-0.23
K^+	-0.36	-0.78
Ca^{++}	0.89	-0.16
Mg^{++}	0.84	0.08
NO_3^-	-0.14	-0.07
NO_2^-	0.00	0.00
F^-	-0.48	-0.78
$As^{+3/+5}$	-0.64	-0.67
PO_4^{3-}	-0.67	-0.31
pH	-0.72	0.01
SDT	0.95	0.23
Sal	0.83	-0.33
Cond	0.86	-0.30
Ox	-0.88	0.38
T	0.80	-0.11

4.2. Biomarcadores

Los individuos utilizados como bioindicadores fueron capturados en el caso de *Rhinella arenarum* durante su primer pulso de reproducción a comienzos de la temporada de lluvias de primavera (Tabla 13). La vegetación interna y externa de la laguna se encontró poco desarrollada durante esta época. No se encontraron individuos de esta especie en LagY.

Tabla 13. Tamaño muestral de individuos utilizados como bioindicadores correspondiente a la especie *R. arenarum*.

Sitios	J	H	M	Total Adultos	Total
LagBL	0	5	5	10	10
LagC	1	5	4	9	10
LagG	0	2	8	10	10
LagS	2	4	4	8	10
LagVM	2	4	4	8	10

Leptodactylus latrans presenta su periodo reproductivo al comienzo del verano (Tabla 14), cuando las lluvias son abundantes y la vegetación es lo suficientemente adecuada para su anidación.

Tabla 14. Tamaño muestral de individuos utilizados como bioindicadores correspondiente a la especie *L. latrans*.

Sitios	J	H	M	Total Adultos	Total
LagBL	4	2	6	8	12
LagC	1	7	2	9	10
LagG	3	6	5	11	14
LagS	3	4	3	7	10
LagVM	4	4	2	6	10
LagY	4	3	3	6	10

4.2.1. Biomarcadores genotóxicos y citotóxicos

4.2.1.1. *Rhinella arenarum*

En la Tabla 15 se observan las frecuencias de los biomarcadores genotóxicos encontrados en los individuos correspondientes a la especie *R. arenarum*.

Se registraron mayores frecuencias de micronúcleos y brotados para los individuos de LagVM. Mientras que mayores frecuencias de escotados, binucleados y globulares se registraron para los individuos de LagC (Figura 13).

Tabla 15. Micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de individuos de *R. arenarum* (Referencias: *n*= número de individuos, *Mn*= Micronúcleos, *ANE*= Anormalidades Nucleares Eritrocitarias, *LagS*=Laguna Sur, *LagVM*=Laguna Vaca Muerta, *LagG*=Laguna Gigante, *LagC*=Laguna Canaleta, *LagBL*=Laguna Brazo Largo).

	n	% Mn	ANE			
			%Escotado	%Binucleado	%Brotado	%Globular
LagS	10	0	4.05±7.00	0	0.57±0.49	0
LagVM	10	0.28±0.63	3.44±4.47	0	5.71±5.26	0.10±0.31
LagG	10	0.08±0.26	2.14±1.13	0	0.90±0.90	0.10±0.31
LagC	10	0.20±0.62	9.11±11.23	0.29±0.65	3.10±4.62	0.29±0.47
LagBL	10	0.16±0.51	2.02±2.39	0.09±0.29	3.91±4.47	0.24±0.77

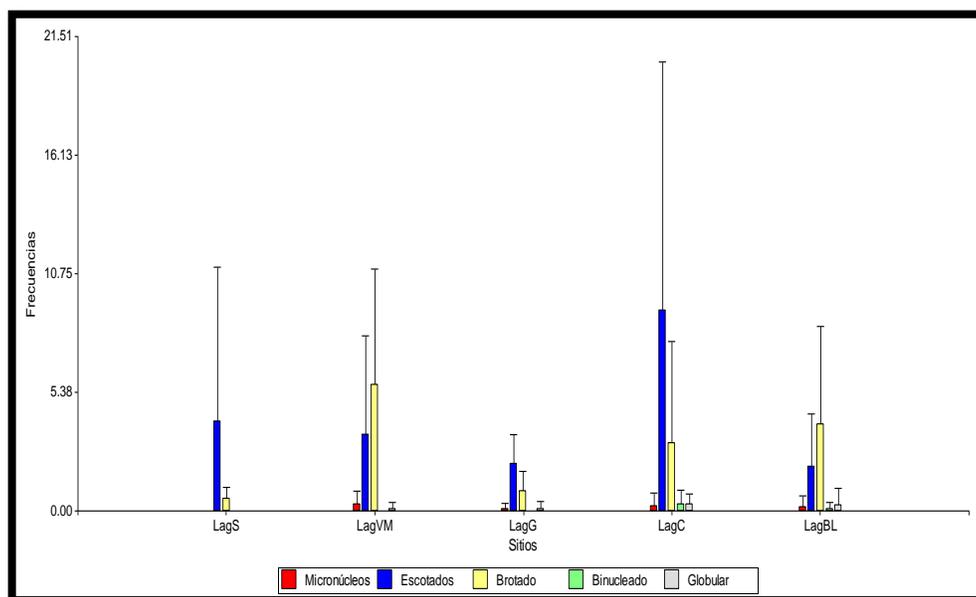


Figura 13. Frecuencias de biomarcadores genéticos y sus desvíos para *R. arenarum* (Referencias: *LagS=Laguna Sur*, *LagVM=Laguna Vaca Muerta*, *LagG=Laguna Gigante*, *LagC=Laguna Canaleta*, *LagBL=Laguna Brazo Largo*).

Se consideró a las Anormalidades Genéticas Totales (AGT) como la sumatoria de las frecuencias de los biomarcadores genotóxicos (Mn y ANE). El modelo lineal generalizado dio como resultado un $F=19.01$ ($p<0.0001$). En la Figura 14 se observa con el test a posteriori la prueba de Di Rienzo, Guzman y Casanoves (DGC) que se diferenciaron LagG y LagS de LasVM, LagC, LagBL.

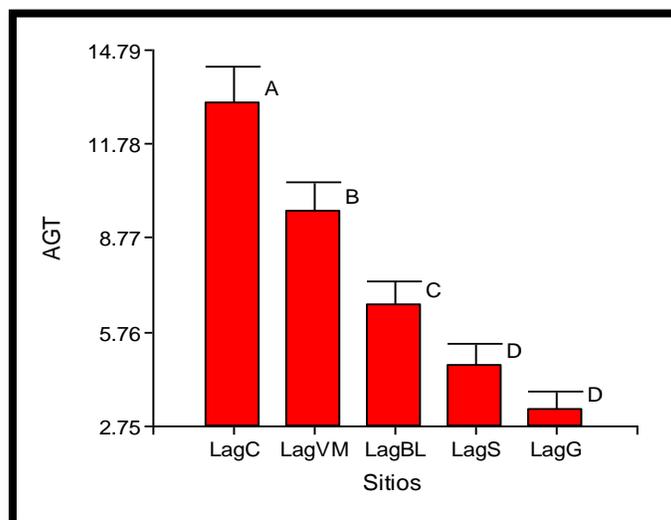


Figura 14. Anormalidades Genéticas Totales de la especie *R. arenarum* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagBL=Laguna Brazo Largo; LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente ($p > 0.05$).

En la Tabla 16, se observa que los individuos de LagVM y LagBL presentaron mayores frecuencias de células en mitosis. LagVM fue el único sitio con células anucleadas y amitosis. En la Figura 15 se observan las amitosis, mitosis y anucleados registradas para la especie. El sitio con mayor variedad de anormalidades citotóxicas correspondió a LagVM.

Tabla 16. Biomarcadores citotóxicos en eritrocitos de individuos de *R. arenarum* (Referencias: n= número de individuos, p/p= puente plasmático, EI= Eritrocitos inmaduros, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo).

	n	%Mitosis	%Núcleo p/p	%Anucleado	%EI	%Amitosis
LagS	10	0	0	0	51.58±24,66	0
LagVM	10	0.19±0.62	0	0.10±0.31	38.67±53.92	0.39±1.24
LagG	10	0	0	0	12.32±13.33	0
LagC	10	0.09±0.30	0	0	32.43±31.65	0
LagBL	10	0.19±0.61	0	0	50.19±31.96	0

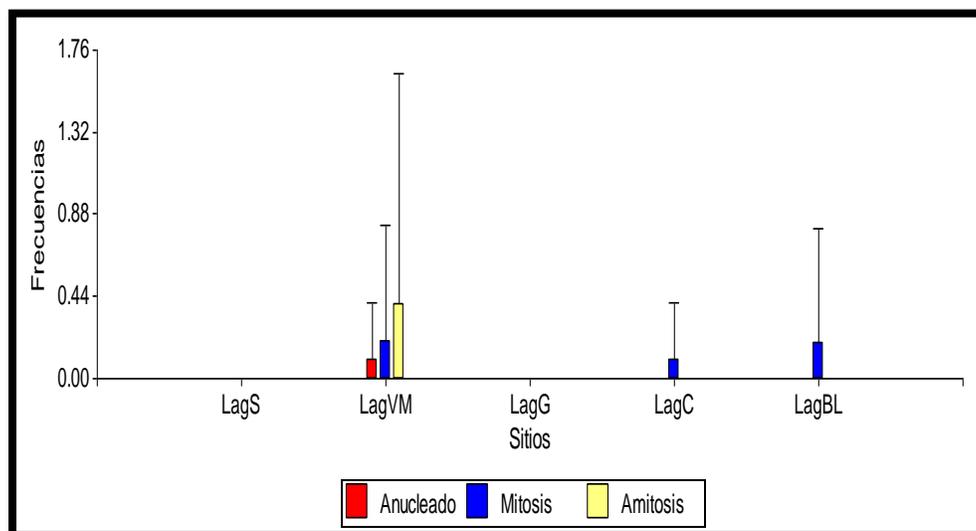


Figura 15. Biomarcadores citotóxicos y sus desvíos para la especie *R. arenarum* (Referencias: *LagS=Laguna Sur*, *LagVM=Laguna Vaca Muerta*, *LagG=Laguna Gigante*, *LagC=Laguna Canaleta*, *LagBL=Laguna Brazo Largo*).

El biomarcador citotóxico, eritrocitos inmaduros, se analizó por separado en la Figura 16. La mayor frecuencia de eritrocitos inmaduros se registró en los individuos de las LagS y LagBL. Sin embargo, LagS presentó un mayor desvío respecto a LagBL.

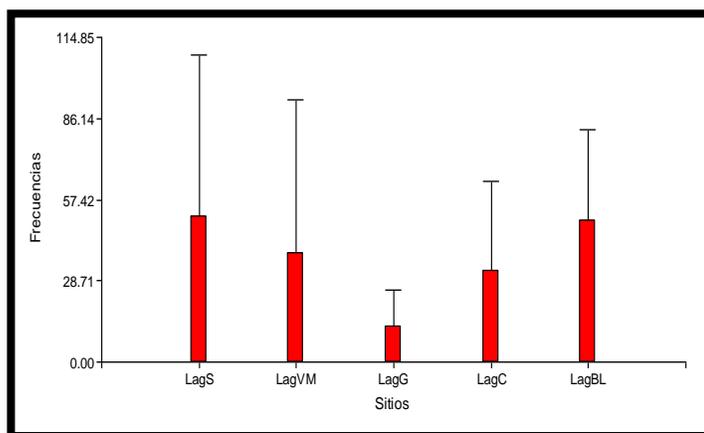


Figura 16. Frecuencia de eritrocitos inmaduros y sus desvíos de *R. arenarum* (Referencias: *LagS=Laguna Sur*, *LagVM=Laguna Vaca Muerta*, *LagG=Laguna Gigante*, *LagC=Laguna Canaleta*, *LagBL=Laguna Brazo Largo*).

Al igual que con los biomarcadores genotóxicos, se sumaron las frecuencias de biomarcadores citotóxicos como Anormalidades Citotóxicas Totales (ACT).

El modelo lineal generalizado revela diferencias significativas ($F=61.05$ y $p<0.001$) entre lagunas, para ACT. En la Figura 17, LagG se diferenció del resto de los sitios, seguido por LagC, y LagVM. LagS y LagBL resultaron similares entre sí, y diferentes al resto.

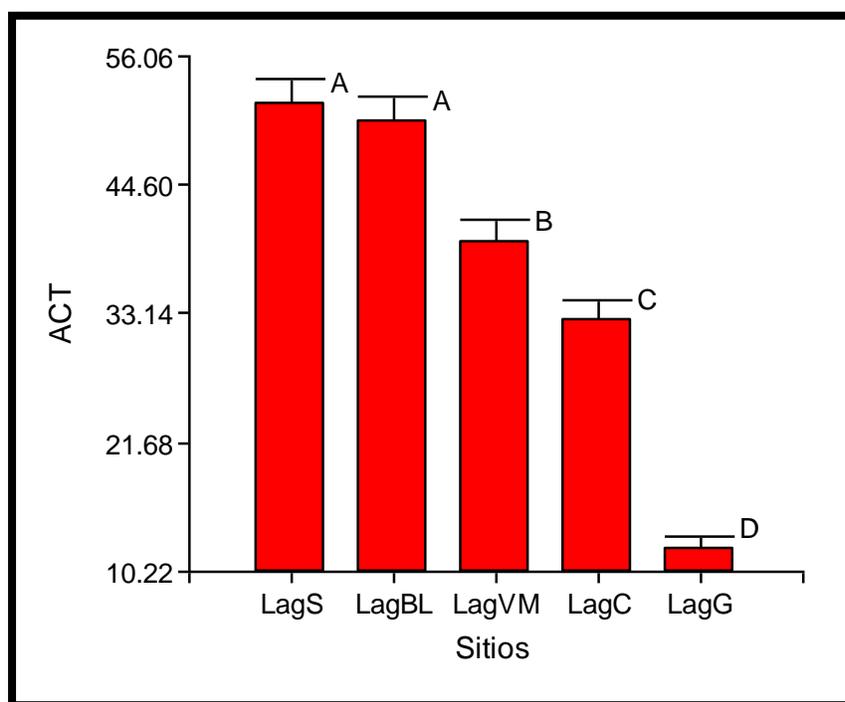


Figura 17. Anormalidades Citotóxicas Totales (AGT) de la especie *R. arenarum* para cada sitio. (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente ($p > 0.05$).

4.2.1.2. *Leptodactylus latrans*

En la Tabla 17 se observa las frecuencias de biomarcadores genéticos para la especie *L. latrans* en todas las lagunas estudiadas. Los individuos de LagY tienen altas frecuencias de células con núcleos micronúcleos, escotados, brotados y globulares. Células con núcleos binucleares solo se registraron en LagBL y LagC (Figura 18).

Tabla 17. Micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de individuos de *L. latrans*. (Referencias: n= número de individuos, Mn= Micronúcleos, ANE= Anormalidades Nucleares Eritrocitarias, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).

	n	%o Mn	ANE			
			%oEscotado	%oBinucleado	%oBrotado	%oGlobular
LagS	10	0.10±0.31	2.44±3.20	0	0.98±1.73	0
LagVM	10	0.10±0.31	4.67±5.94	0	0.08±0.26	0
LagG	14	0.28±0.82	4.13±3.54	0	0.07±0.26	0
LagC	10	0.37±0.88	3.71±2.98	0.09±0.29	2.93±3.30	0.18±0.59
LagBL	12	0.48±0.64	2.68±3.02	0.09±0.29	4.47±5.31	0
LagY	10	0.88±0.27	4.10±3.34	0	6.52±5.48	0.19±0.62

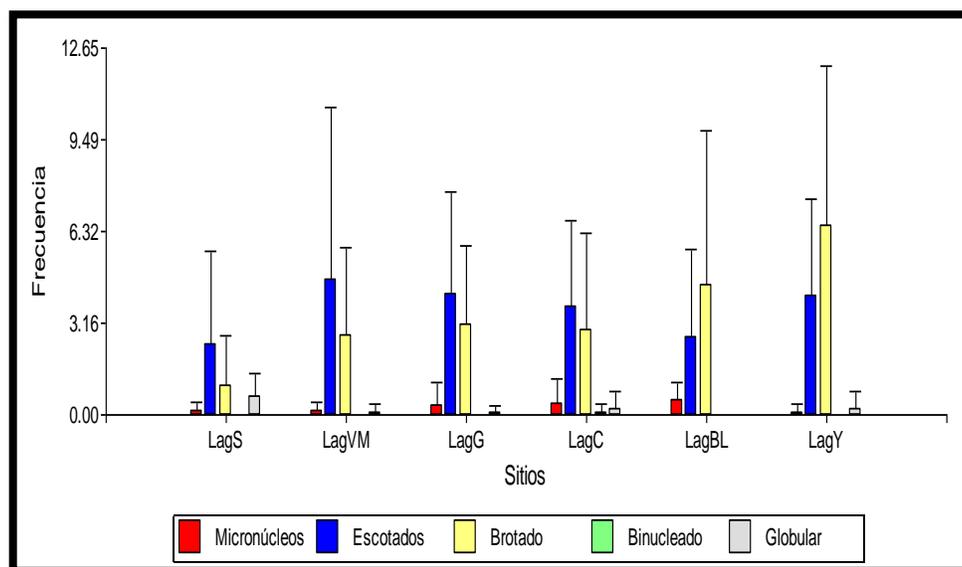


Figura 18. Frecuencias de biomarcadores genotóxicos y sus desvíos para la especie *L. latrans* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).

Al igual que en *R. arenarum*, las frecuencias de biomarcadores genéticos se sumaron. De los resultados obtenidos a partir del modelo lineal generalizado ($F=5.90$ y $p<0.0002$), se observa que LagS se diferenció de las restantes lagunas con la menor frecuencia de anomalías genéticas totales (Figura 19).

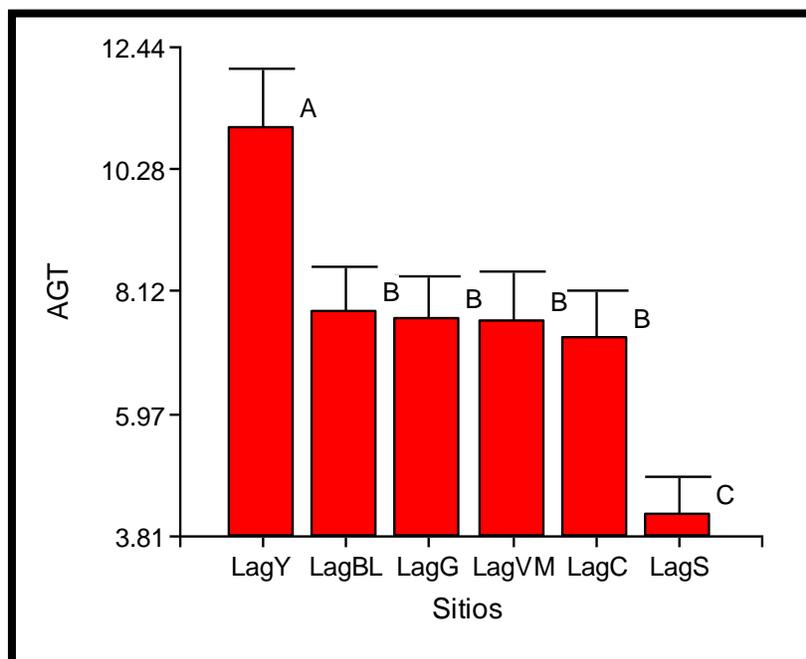


Figura 19. Anormalidades Genotóxicas Totales (AGT) de la especie *L. latrans* para cada sitio (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente ($p > 0.05$).

En el gráfico de barras de la Figura 20, se observan las frecuencias de los biomarcadores citotóxicos para los individuos de la especie *L. latrans*. Los individuos de la LagS registraron mayores frecuencias de mitosis. Para los individuos de LagY se observa frecuencias mayores para anucleados y amitosis (Tabla 18).

Tabla 18. Biomarcadores hematológicos en eritrocitos de individuos de *L. latrans* (Referencias: n= número de individuos, p/p= puente plasmático, EI= Eritrocitos inmaduros, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).

	n	%Mitosis	%Núcleo p/p	%Anucleado	%EI	%Amitosis
LagS	10	0.29±0.47	0	0	47.77±26.71	0
LagVM	10	0	0	0.10±0.31	32.72±23.99	1,31±2,27
LagG	14	0	0	0	13.63±9.14	0
LagC	10	0	0	0	17.53±15.73	0
LagBL	12	0	0	0	32.04±27.38	0
LagY	10	0.10±0.30	0	0.10±0.31	20.98±16.35	0

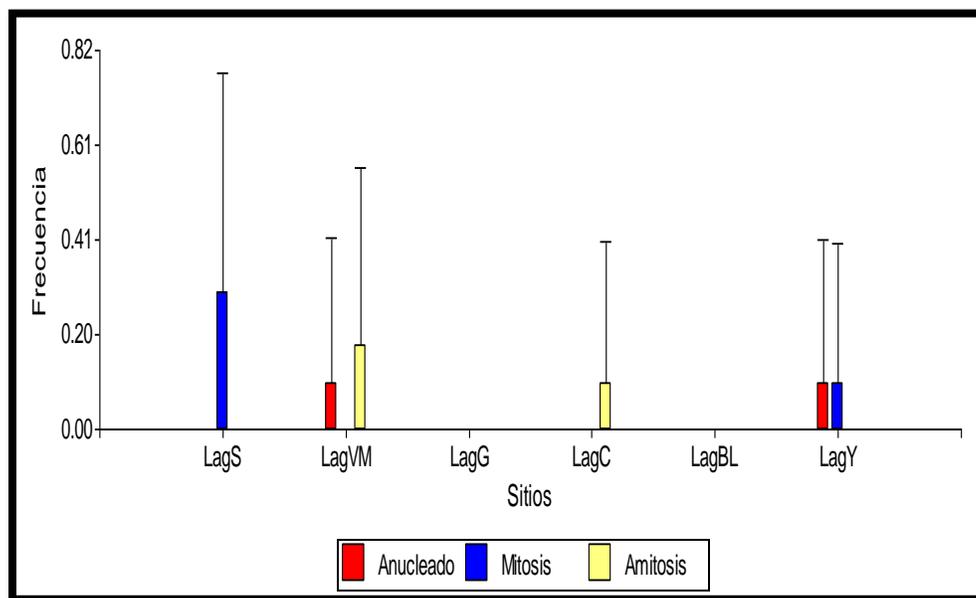


Figura 20. Frecuencias de las biomarcadores citotóxicos y sus desvíos para los individuos de la especie *L. latrans*. (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).

Los eritrocitos inmaduros presentaron las mayores frecuencias para los individuos de las LagBL y LagVM, mientras que las menores frecuencias lo mostraron los individuos de LagS (Figura 21).

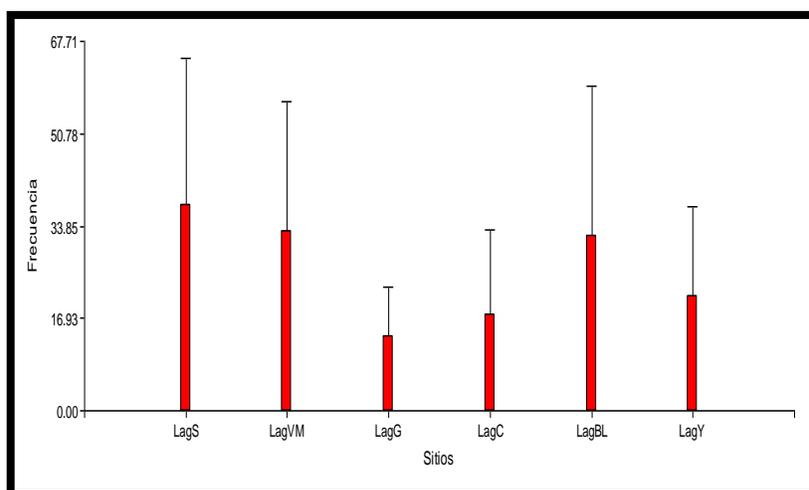


Figura 21. Frecuencia de eritrocitos inmaduros y sus desvíos para la especie *L. latrans* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).

Se consideró también sumar las frecuencias de biomarcadores citotóxicos y denominarlos ACT (Anormalidades Citotóxicas Totales) para el modelo lineal generalizado. Este revela una diferencia significativa entre lagunas para los biomarcadores citotóxicos de la especie ($F=35.77$ y $p<0.0001$). En la Figura 22 se observan diferencias entre los individuos de LagC y LagY del resto de las lagunas. Las LagVM, LagBL y LagS son similares entre sí.

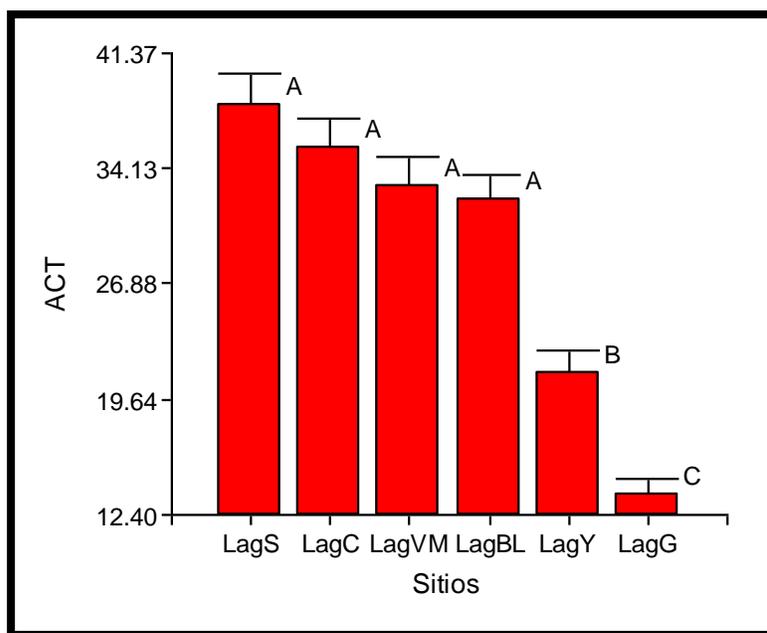


Figura 22. Anormalidades Citotóxicas Totales (ACT) para la especie *L. latrans* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente ($p>0.05$).

4.2.2. Fórmula leucocitaria

Para la fórmula leucocitaria se consideraron los individuos de las dos especies estudiadas en estado adulto y maduro sexualmente.

4.2.2.1. *Rhinella arenarum*

En la Figura 23 se observa que los individuos de LagBL presentan los mayores porcentajes de linfocitos (maduros e inmaduros). Los individuos de LagG con mayores frecuencias de neutrófilos unilobulados, y los individuos de LagS, en neutrófilos trilobulados y eosinófilos. Los individuos de LagVM presentaron el mayor porcentaje de neutrófilos bilobulados, basófilos y monocitos respecto a individuos de los otros sitios (Tabla 19).

Tabla 19. Fórmula leucocitaria para los individuos de *R. arenarum* (Referencias: *n*=número de individuos, LM= Linfocitos maduros, LI= Linfocitos inmaduros, N1= Neutrófilo unilobular, N2= Neutrófilo bilobular, N3= Neutrófilo trilobular, E= Eosinófilos, B= Basófilos, M= Monocitos, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo).

	n	LM	LI	N1	N2	N3	E	B	M
LagS	10	68.77±23.88	10.51±10.06	1.95±2.35	4.83±4.95	0.78±1.03	8.14±7.45	3.73±3.31	1.28±1.36
LagVM	10	63.45±19.84	11.54±16.03	2.13±2.89	6.28±4.49	0.29±0.48	7.15±3.61	7.61±4.30	1.53±1.18
LagG	10	68.73±20.89	3.74±3.04	11.55±13.27	5.14±4.34	0.1±0.32	6.48±7.45	4.92±2.29	0.48±0.51
LagC	10	89.81±5.94	1.19±1.47	2.17±2.64	2.15±1.92	0.29±0.67	1.93±1.68	1.35±1.25	1.08±1.10
LagBL	10	91.49±39.41	48.37±34.25	1.61±1.99	1.39±1.77	0	1.87±1.42	2.04±2.98	0.53±0.99

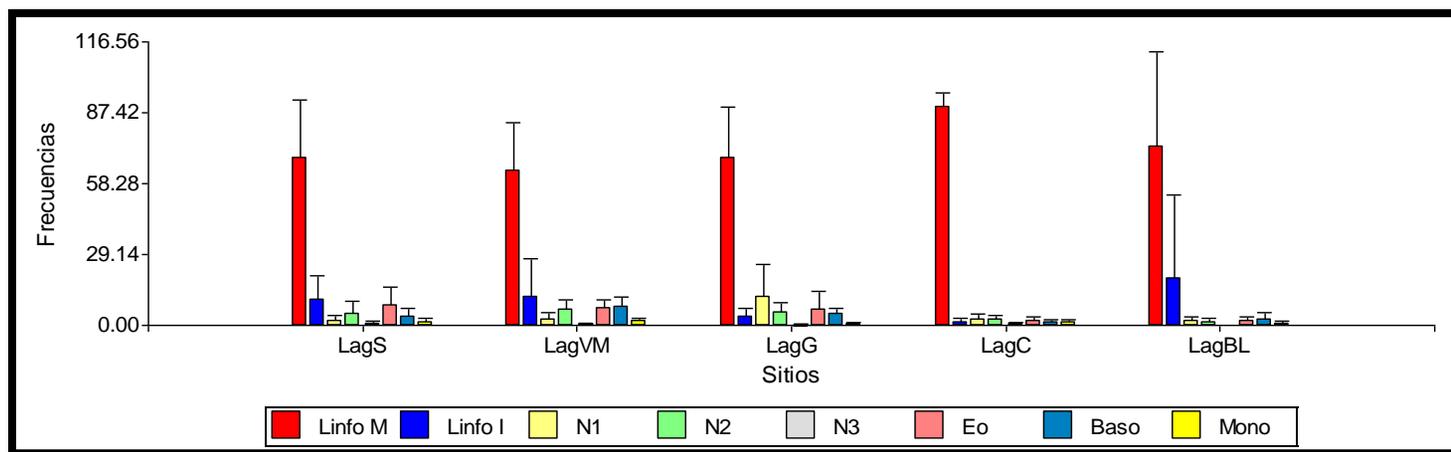


Figura 23. Fórmula leucocitaria y sus desvíos para la especie *R. arenarum* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo, Linfo M=Linfocitos maduros, Linfo I=Linfocitos inmaduros, N1=Neutrófilos unilobulados, N2=Neutrófilos bilobulados, N3=Neutrófilos trilobados, Eo=Eosinófilos, Baso=Basófilos, Mono=Monocitos).

De acuerdo al modelo lineal generalizado, se encontraron diferencias para linfocitos maduros (Lin M) de los individuos de LagC ($F=13.97$ y $p<0.0001$) (Figura 24a). Los linfocitos inmaduros (Lin I), en cambio, registran diferencias estadísticas significativas ($F=38.86$ y $p<0.0001$) para los individuos de LagBL respecto a los individuos del resto de los sitios (Figura 24b). Los neutrófilos unilobulados (N1) de los individuos de LagG (Figura 24b) se diferenciaron estadísticamente con el resto de los sitios ($F=35.02$ y $p<0.0001$). Los neutrófilos bilobulados (N2) y eosinófilos de los individuos de las lagunas LagC y LagBL se diferenciaron estadísticamente del resto de los sitios ($F=9.69$ y $p<0.001$; $F=14.92$ y $p<0.001$) (Figura 24d y f), mientras que para los neutrófilos trilobulados no se encontraron diferencias. Por último, los basófilos (Baso) de los individuos de LagVM (Figura 24g) se diferenciaron de los de LagG y LagS, y estos de LagC y LagBL ($F=13.62$ y $p=0.0002$).

Con respecto a los índices, los individuos de LagC presentaron el mayor valor de ($N/L=0.29$), mientras que el menor fue registrado para los individuos de LagBL ($N/L=0.03$). Si bien no se registraron diferencias estadísticas.

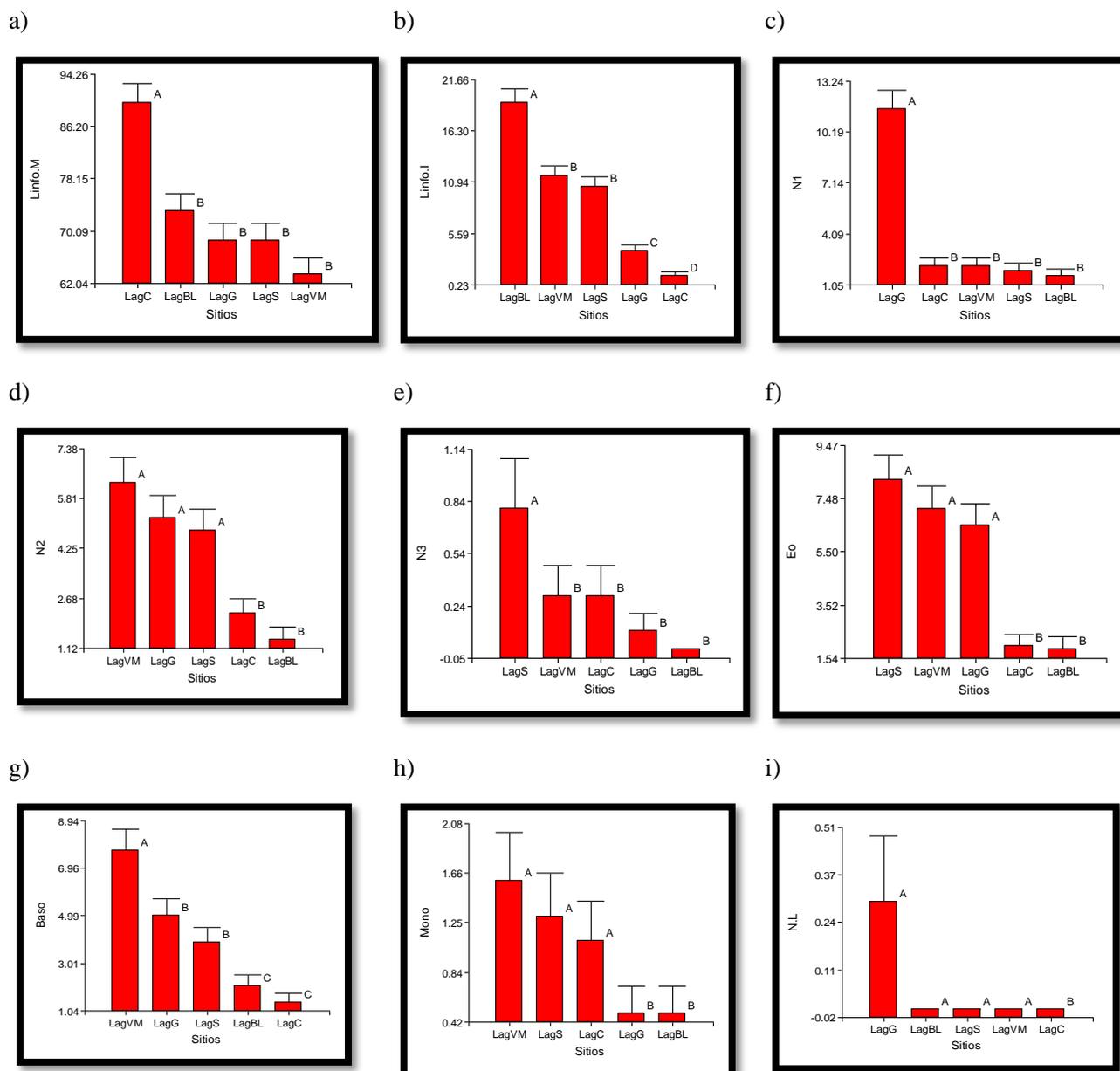


Figura 24. Gráficos del modelo lineal generalizado para la fórmula leucocitaria de *R. arenarum* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo, Linfo M=Linfocitos maduros, Linfo I=Linfocitos inmaduros, N1=Neutrófilos unilobulados, N2=Neutrófilos bilobulados, N3=Neutrófilos trilobados, Eo=Eosinófilos, Baso=Basófilos, Mono=Monocitos). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

4.2.2.2. *Leptodactylus latrans*

En la Figura 25 se observa la fórmula leucocitaria de *L. latrans*. Los linfocitos maduros (Linfo M) tienen una proporción mayor para los individuos de LagBL, mientras que los individuos de LagS y LagY, menor proporción. Mientras que, para los linfocitos inmaduros (Lin I) ocurre lo inverso. Los neutrófilos unilobulados (N1) y los eosinófilos (Eo) tienen altas frecuencias en los individuos de LagY. En el caso de los neutrófilos bilobulados (N2) y monocitos (Mono) para los individuos de LagVM. Los individuos de LagG presentan las mayores proporciones de neutrófilos trilobulados (N3). Por último, los individuos de LagS presentaron las mayores frecuencias de basófilos (Baso) (Tabla 20).

Tabla 20. Fórmula leucocitaria para los individuos de *L. latrans* (Referencias: n=número de individuos, LM= Linfocitos maduros, LI= Linfocitos inmaduros, N1= Neutrófilo unilobular, N2= Neutrófilo bilobular, N3= Neutrófilo trilobular, E= Eosinófilos, B= Basófilos, M= Monocitos, LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).

	n	LM	LI	N1	N2	N3	E	B	M
LagS	10	50.57±24.42	14.67±9.57	9.07±9.09	8.88±8.29	0.29±0.65	10.15±14.23	4.39±5.27	1.97±2.03
LagVM	10	63.15±22.39	10.48±6.74	5.30±5.42	8.99±7.78	0.38±0.66	7.12±6.44	2.34±3.29	2.19±1.82
LagG	14	78.28±11.23	4.16±3.86	5.54±6.48	4.27±3.01	0.43±0.84	4.67±4.83	1.92±1.73	1.70±1.01
LagC	10	77.70±19.15	12.00±16.28	3.21±1.51	2.02±1.98	0.18±0.39	2.96±3.79	0.77±1.00	1.12±1.57
LagBL	12	86.49±7.61	2.91±3.28	3.45±2.28	2.09±2.97	0.27±0.97	2.91±3.32	2.04±1.65	0.90±1.00
LagY	10	58.80±16.15	4.99±1.92	10.38±6.23	8.83±7.03	0.17±0.37	10.95±6.72	3.33±2.66	2.50±2.11

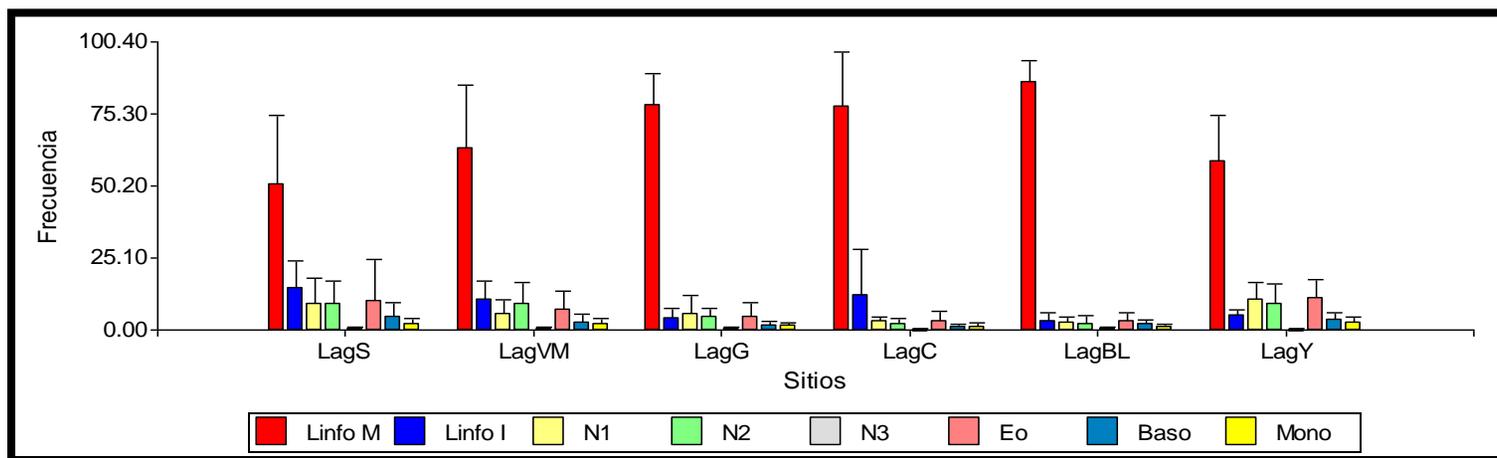
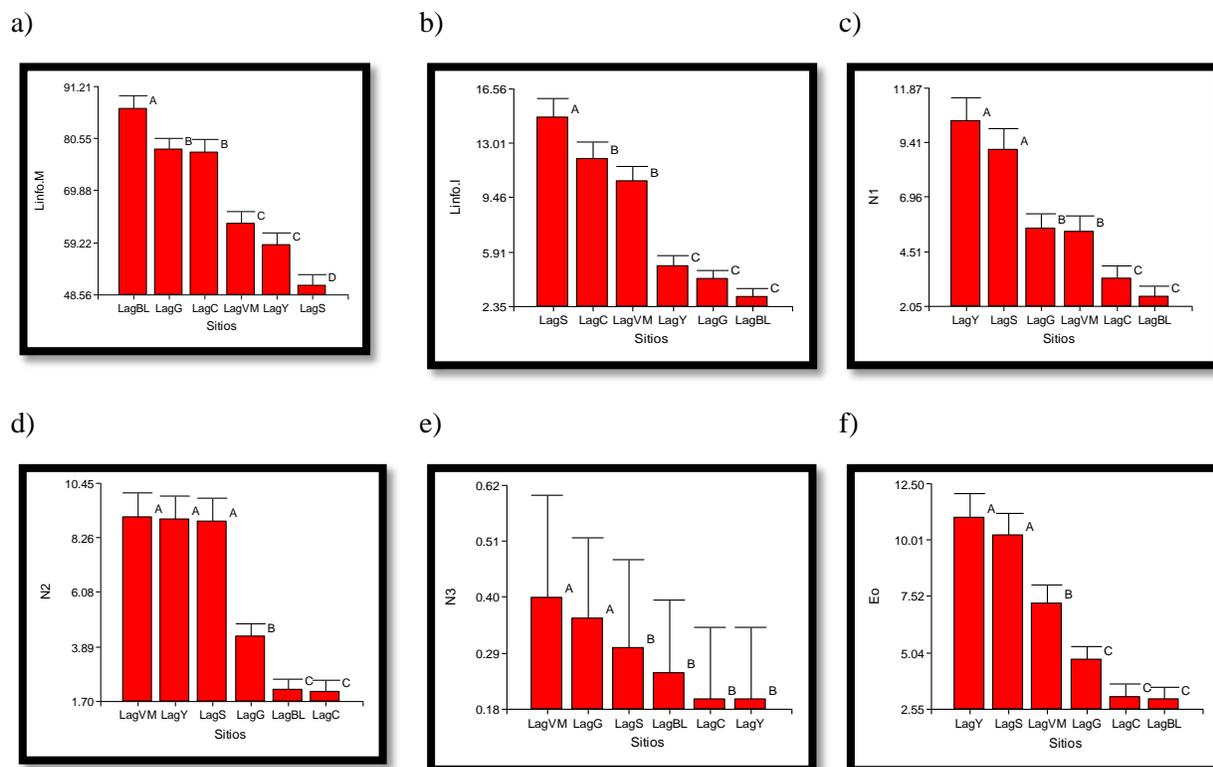


Figura 25. Fórmula leucocitaria y sus desvíos para *L. latrans* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal, Linfo M=Linfocitos maduros, Linfo I=Linfocitos inmaduros, N1=Neutrófilos unilobulados, N2=Neutrófilos bilobulados, N3=Neutrófilos trilobulados, Eo=Eosinófilos, Baso=Basófilos, Mono=Monocitos).

Conforme al modelo lineal generalizado, los individuos de la LagBL se diferenciaron de las otras lagunas para los linfocitos maduros (Lin M) con un $F=29.17$ y $p<0.0001$ (Figura 26a). LagS se diferenció con un $F=28.11$ y $p<0.0001$, por un lado con LagC y LagVM, y por el otro con LagY, LagG y LagBL para los linfocitos inmaduros (Lin I) (Figura 26b). Para los neutrófilos unilobulados (N1) se diferenciaron tres grupos (Figura 26c): LagY con LagS, LagG con LagVM, y LagC con LagBL ($F=15.89$ y $p<0.0001$). Al igual que para los neutrófilos bilobulados (N2) (Figura 26d): LagG se diferenció de LagVM, LagY y LagS, por un lado, LagBL con LagC ($F=19.38$ y $p<0.0001$). Los individuos de LagVM se diferenciaron con respecto a los eosinófilos (Eo) con dos grupos (Figura 26e): LagC, LagBL y LagG, y por el otro con LagY y LagS ($F=18.71$ y $p<0.0001$). Por último, los individuos de LagC y LagG se diferenciaron para basófilos (Baso) con el resto de los sitios: LagBL y LagVM, y LagY y LagS con un $F=7.29$ y $p=0.0007$ (Figura 26f). Con respecto a los neutrófilos trilobados (N3) y monocitos (Mono) no se registraron diferencias.

Con respecto a los índices, los individuos de LagS presentaron los mayores valores de $N/L=0.39$. Mientras que los valores menores correspondieron para los individuos de LagBL con un $N/L=0.06$.



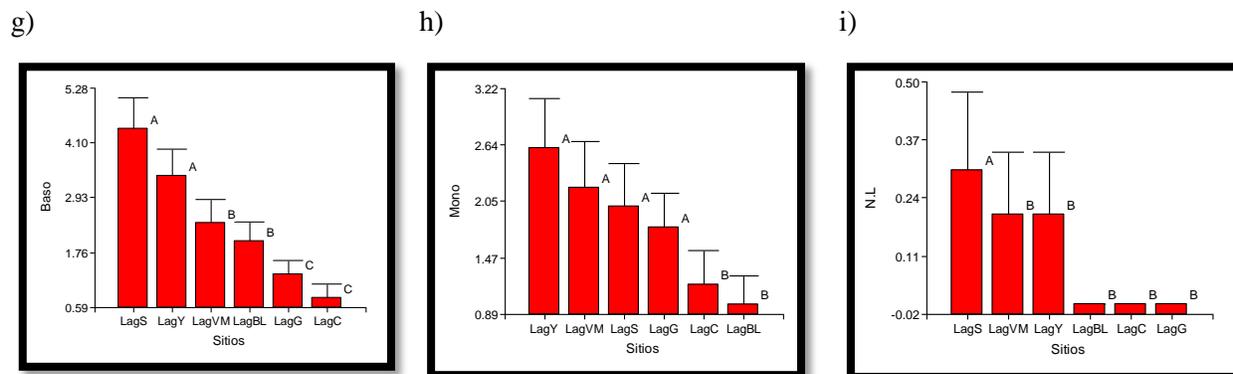


Figura 26. Gráficos del modelo lineal generalizado para la fórmula leucocitaria de *L. latrans* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo, LagY=Laguna Yuyal, Linfo M=Linfocitos maduros, Linfo I=Linfocitos inmaduros, N1=Neutrófilos unilobulados, N2=Neutrófilos bilobulados, N3=Neutrófilos trilobados, Eo=Eosinófilos, Baso=Basófilos, Mono=Monocitos). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

4.2.3. Variables ambientales versus parámetros biológicos

Se realizó un análisis de correspondencia canónica (ACC) entre las variables ambientales y los parámetros biológicos correspondientes a los individuos de todas lagunas. Entre las variables ambientales consideradas se incorporaron al análisis las medias de aquellas variables del tipo cuantitativa, asociadas principalmente a la calidad de las aguas, y se eliminaron aquellas que presentaban más del 90% de correlación. Mientras que para los parámetros biológicos, se consideró a los micronúcleos (Mn), Anormalidades Nucleares Eritrocitarias (ANE), Anormalidades Citotóxicas Totales (ACT), Eritrocitos Inmaduros (EI) y glóbulos blancos de la fórmula leucocitaria.

El gráfico triplot obtenido para la especie *Rhinella arenarum*, en el primer plano factorial, recogió el 73% de la inercia total de ACC.

LagC y LagBL se asociaron a variables ambientales nitratos (NO_3^-), sólidos disueltos totales (SDT) y fosfatos (PO_4^{3-}). Mientras que en relación a los parámetros biológicos, micronúcleos (Mn) y anormalidades nucleares eritrocitarias (ANE) se asociaron a estas lagunas (Figura 27).

LagG y LagS se asociaron a las variables ambientales sulfatos (SO_4^-), cloruros (Cl^-) y magnesio (Mg^{++}). Mientras que de los parámetros biológicos, a los neutrófilos (N) y eosinófilos (E) de la fórmula leucocitaria (Figura 27).

LagVM se asoció a arsénico (As^-), flúor (F^-), pH y turbidez (T) de variables ambientales, mientras que anomalidades citotóxicas totales (ACT) y monocitos (M) en cuanto a los parámetros biológicos (Figura 27).

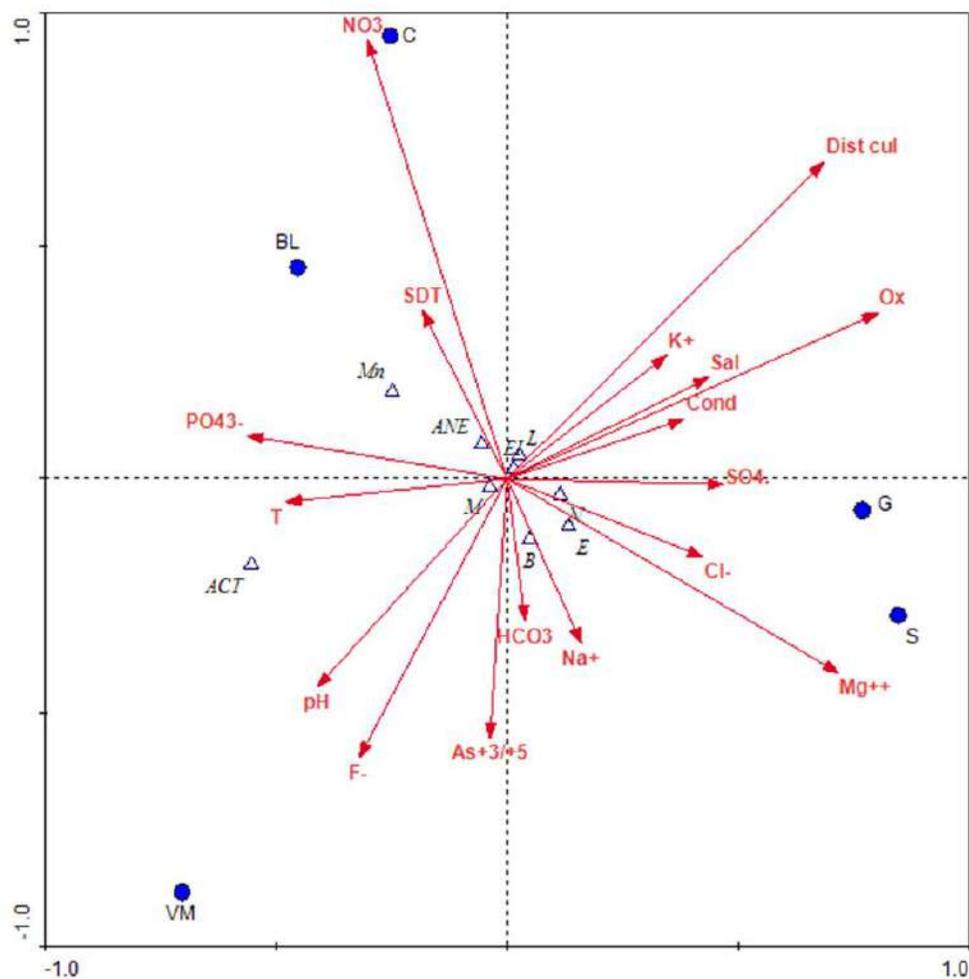


Figura 27. Gráfico triplot de correspondencia canónica para la especie *R. arenarum*. Los puntos azules representan las lagunas, mientras que los triángulos, los parámetros biológicos. Las flechas rojas, las variables ambientales. (Referencias: S: Laguna Sur, VM: Laguna Vaca Muerta, G: Laguna Gigante, C: Laguna Canaleta, BL: Brazo Largo, Mn: Micronúcleos, ANE: Anormalidades Nucleares Eritrocitarias, ACT: Anormalidades Citotóxicas Totales, EI: Eritrocitos Inmaduros, L: Linfocitos, N: Neutrófilos, E: Eosinófilos, B: Basófilos, M: Monocitos, HCO_3 : Bicarbonatos; SO_4^- : Sulfatos; Cl^- : Cloruros; Na^+ : ión sodio; K^+ : ión potasio; Mg^{++} : ión magnesio; NO_3^- : Nitrato; F^- : Flúor; $\text{As}^{+3/+5}$: Arsénico; PO_4^{3-} : Fosfatos; SDT: Sólidos Disueltos Totales; Sal: Salinidad; Ox: Oxígeno; Distancia al cultivo, Turv: Turbidez).

El gráfico triplot obtenido para la especie *Leptodactylus latrans*, en el primer plano factorial, recogió el 66% de la inercia total de ACC.

LagC, LagBL y LagG se asociaron a las variables ambientales nitratos (NO_3^-), cloruros (Cl^-), pH y fosfatos (PO_4^{3-}). Mientras que en relación a los parámetros biológicos, estas lagunas se asociaron a los micronúcleos (Mn) (Figura 28).

LagS se asoció a las variables ambientales arsénico (As-), flúor (F-), pH, bicarbonatos (HCO_3^-) y sodio (Na^+). Mientras que de los parámetros biológicos, no se asoció a ninguna (Figura 28).

LagVM y LagY se asociaron a la turbidez (T), distancia a cultivo (Dist cul), magnesio (Mg^{++}) y sólidos disueltos totales (SDT) de variables ambientales, mientras que anomalías citotóxicas totales (ACT) y eritrocitos inmaduros (EI) en cuanto a los parámetros biológicos (Figura 28).

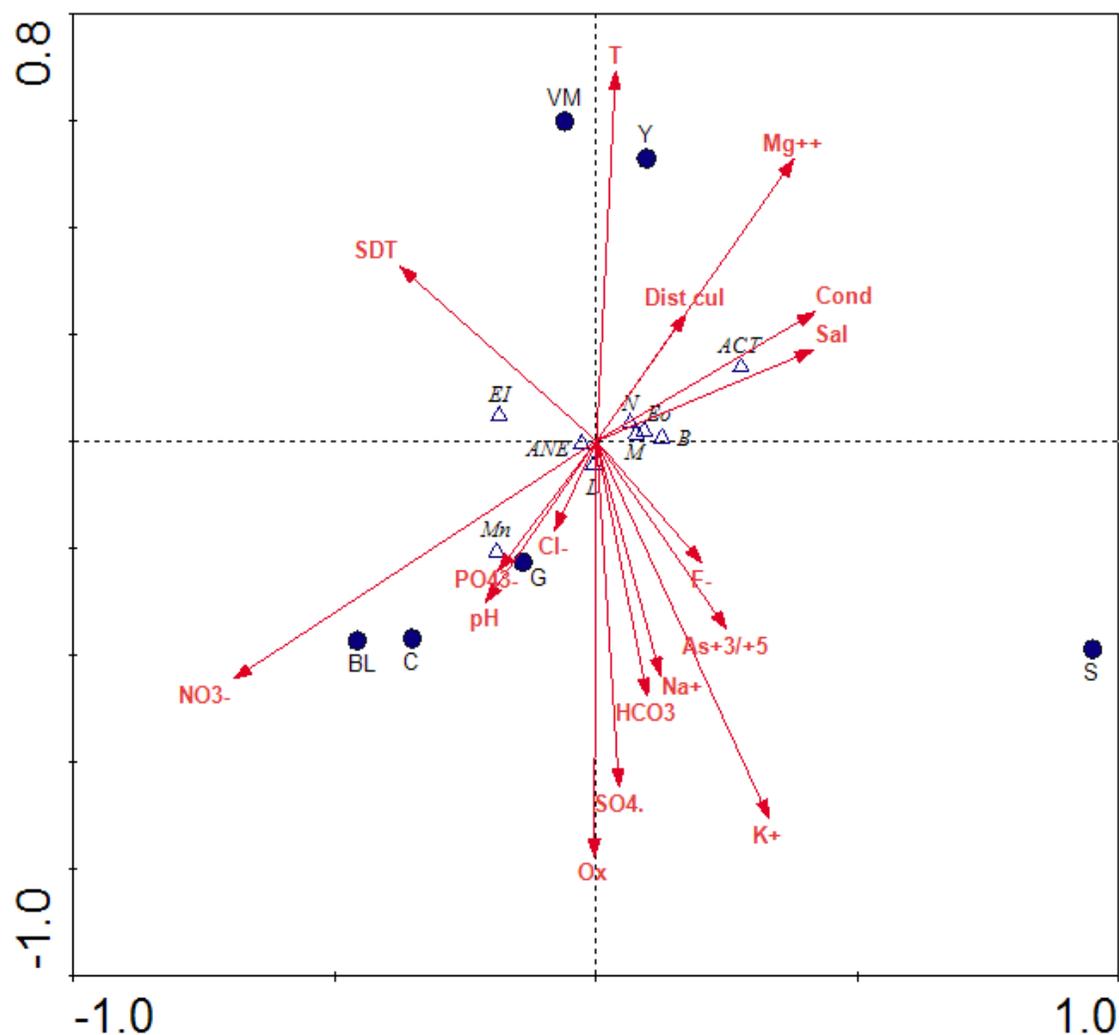


Figura 28. Gráfico triplot de correspondencia canónica para la especie *L. latrans*. Los puntos azules representan las lagunas, mientras que los triángulos, los parámetros biológicos. Las flechas rojas, las variables ambientales (Referencias: S: Laguna Sur, VM: Laguna Vaca Muerta, G: Laguna Gigante, C: Laguna Canaleta, BL: Brazo Largo, Y: Laguna Yuyal, Mn: Micronúcleos, ANE: Anormalidades Nucleares Eritrocitarias, ACT: Anormalidades Citotóxicas Totales, EI: Eritrocitos Inmaduros, L: Linfocitos, N: Neutrófilos, E: Eosinófilos, B: Basófilos, M: Monocitos, HCO_3^- : Bicarbonatos; SO_4^- : Sulfatos; Cl^- : Cloruros; Na^+ : ión sodio; K^+ : ión potasio; Mg^{++} : ión magnesio; NO_3^- : Nitrato; F^- : Flúor; $\text{As}^{+3/+5}$: Arsénico; PO_4^{3-} : Fosfatos; SDT: Sólidos Disueltos Totales; Sal: Salinidad; Ox: Oxígeno; Distancia al cultivo, T: Turbidez).

4.2.4. Anormalidades morfológicas

Con el LHC (Largo hocico cloaca) y el peso de los individuos se calculó el índice de condición corporal. Sin embargo, no se registraron diferencias en cuanto a la condición corporal para ninguna de las especies estudiadas.

4.2.4.1. Condición corporal de adultos de *Rhinella arenarum*

En la Tabla 21 están representados las variables morfométricas de los individuos correspondientes a la especie *R. arenarum*. No se registraron diferencias estadísticamente significativas a excepción de las hembras. Las hembras de LagVM, de mayor *peso*, presentaron diferencias con un $F=3,09$; $gl=15$; $p=0.05$, respecto a las hembras de las otras lagunas.

Tabla 21. Medidas de Peso, LHC (Longitud Hocico Cloaca) y CC (Condición Corporal) de los individuos de *R. arenarum* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagC=Laguna Canaleta, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagBL=Laguna Brazo largo). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente ($p > 0.05$).

	H			M			J		
	LHC	Peso	CC	LHC	Peso	CC	LHC	Peso	CC
LagS	92.72±10.56	83.75±22.79	0.07±0.05	87.53±7.60	77.00±20.02	0.11±0.01	51.66±5.99	15.00±7.07	0.10±0.01
LagVM	101.76±6.52	136.00±26.23*	0.13±0.01	91.36±11.57	86.25±28.03	0.11±0.01	58.92±9.81	26.00±11.31	0.12±0.01
LagG	90.55±7.28	90.55±7.28	0.12±0.02	85.85±7.89	71.96±19.79	0.11±0.01	-	-	-
LagC	90.95±16.90	94.46±23.91	0.14±0.05	84.84±7.14	76.61±33.54	0.12±0.03	41.03±00.00	6.00±00.00	0.09±0.00
LagBL	92.71±8.03	96.20±22.80	0.12±0.01	93.58±9.61	80.20±37.51	0.09±0.01	-	-	-

4.2.4.2 Condición corporal de adultos de *Leptodactylus latrans*

Las hembras correspondientes a LagY presentaron un LHC mayor con respecto a las hembras de las otras lagunas con un $F=2.86$, $gl=20$, $p=0.0415$. Algo similar ocurrió con una CC menor de las mismas hembras con un $F=2.77$, $gl=20$, $p=0.0465$. En cuanto al peso, fue menor para las hembras de LagS con un $F=3.62$, $gl=20$, $p=0.0173$ (Tabla 22).

Con respecto a los machos, los correspondientes a LagVM presentaron menor CC con un $F=2.93$, $gl=15$, $p=0.0485$.

Y por último, los juveniles correspondiente a LagS y LagVM presentaron menores valores de LHC con un $F=13.80$, $gl=13$, $p=0.0001$.

Tabla 22. Medidas de Peso, LHC (Longitud Hocico Cloaca) y CC (Condición Corporal) de los individuos de *L. latrans* (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagC=Laguna Canaleta, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagBL=Laguna Brazo largo). Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente ($p > 0.05$).

	H			M			J		
	LHC	Peso	CC	LHC	Peso	CC	LHC	Peso	CC
LagS	68.44±15.97	46.75±17.42*	0.15±0.05	91.40±5.98	86.33±19.35	0.11±0.01	35.83±4.71*	35.33±52.55	0.55±0.71
LagVM	81.98±5.87	70.00±15.19	0.13±0.01	63.64±33.04	85.50±16.26	0.64±0.70	45.88±7.18*	13.00±6.38	0.13±0.02
LagG	84.93±3.58	73.88±10.32	0.12±0.02	86.75±10.53	83.00±14.67	0.13±0.04	69.36±16.06	48.37±3.10	0.19±0.16
LagC	82.48±14.50	83.19±15.69	0.16±0.05	77.23±3.50	77.23±3.50	0.17±0.02	78.18±00.00	33.00±00.00	0.07±0.00
LagBL	81.26±1.10	65.50±9.19	0.12±0.01	91.40±5.98	86.33±19.35	0.11±0.01	91.40±5.98	86.33±19.35	0.11±0.01
LagY	98.54±4.66*	68.67±9.87	0.07±0.01*	94.78±2.53	89.33±4.93	0.11±0.01*	79.46±6.31	42.75±11.15	0.08±0.01

4.2.4.3 Anormalidades morfológicas en larvas de *Leptodactylus latrans*

Se registraron varios tipos de malformaciones en el disco oral (Figura 29a-b) y en el abdomen (Figura 29c-d). Los estadios donde se registraron las anomalías fueron entre 27 y 40, sin embargo no se sacaron las frecuencias de anomalías debido a que no se realizó un recuento de las larvas encontradas.

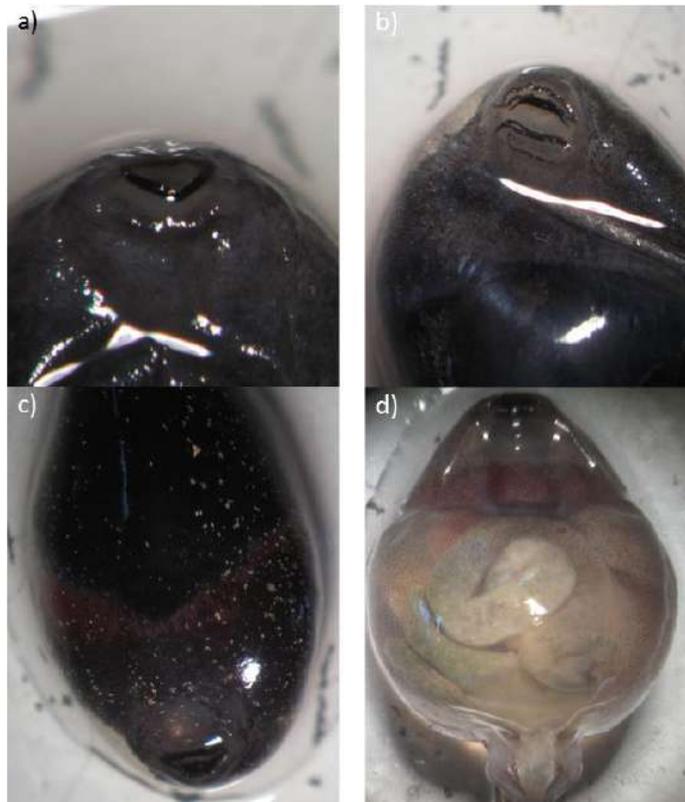


Figura 29. Larvas de *L. latrans* con malformaciones. a) Larva con pico córneo pero sin queratodontes (0/0) en estadio 27 de Gosner, b) Larva sin la base del pico córneo en estadio 27 de Gosner, c) Larva con abdomen rojizo o edema en estadio 28 de Gosner, d) Larva con abdomen hinchado en estadio 40 de Gosner.

3.2.4.4 Anormalidades morfológicas en adultos de *Rhinella arenarum* y *Leptodactylus latrans*

Se registraron tres individuos adultos de *R. arenarum* (dos hembras y un macho) con anormalidades morfológicas en LagVM (Figura 30 a y b). El individuo macho presentó una deformidad en su labio superior que no pudo ser registrada con rayos X. La frecuencia total observada fue de 6.97% para esta especie.

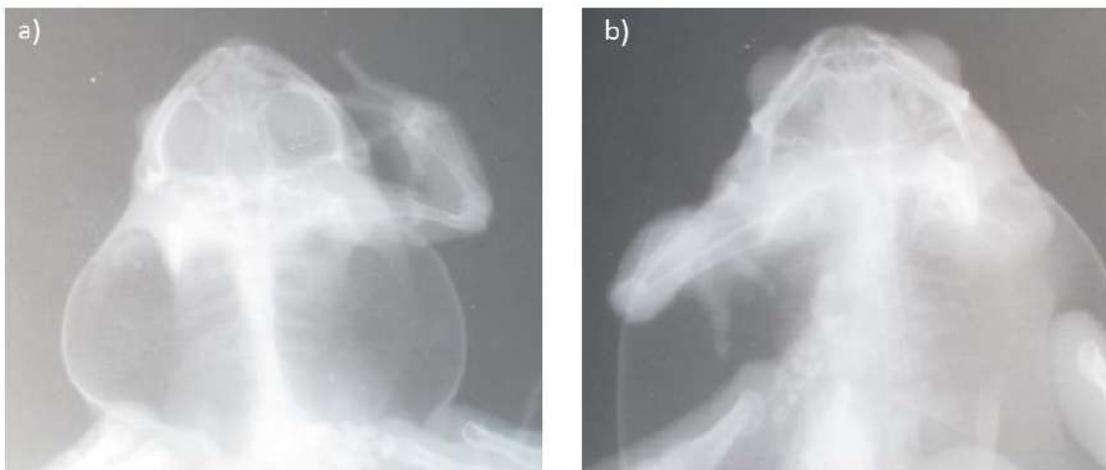


Figura 30. a) Hembra sin la extremidad superior izquierda, y b) Hembra con Ectromelia en extremidad superior derecha en LagVM.

En la Figura 31a, se observa un macho de *R. arenarum* con Polidactilia y en la 31b una hembra de *L. latrans* con fusión de dedos en la LagS. La frecuencia total registrada fue de 1.35% para *R. arenarum* y 2% para *L. latrans*.

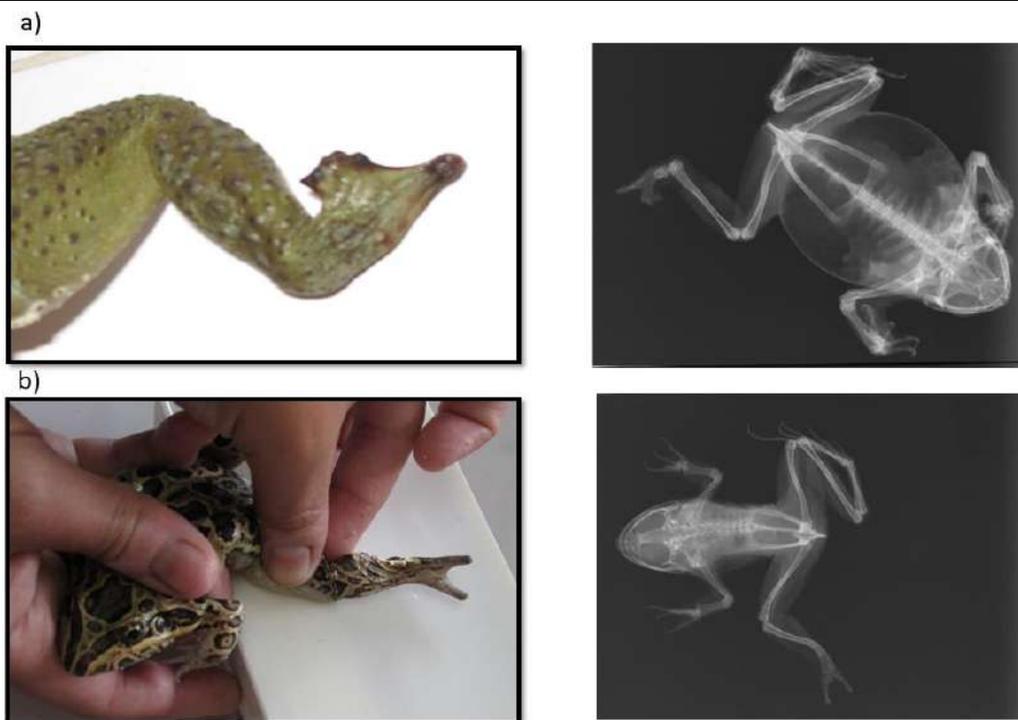


Figura 31. a) Macho de *R. arenarum* con Polidactilia y b) Hembra de *L. latrans* con fusión de dedos en LagS.

4.3. Trabajo experimental de ecotoxicología: Test AMPHITOX

-Mortalidad y supervivencia de larvas de R. arenarum:

De la prueba realizada en condiciones de laboratorio (14 días) con agua superficial de cada uno de los sitios (Figura 32), las concentraciones correspondientes a los sitios LagBL y LagVM, registraron algunos individuos muertos:

*LagBL: El día 14/11/2017, a 8 días de comenzado el experimento, se registró el 10% de mortalidad correspondiente a la concentración 100%. Se observa también aquí el canibalismo entre larvas donde principalmente consumían el estómago del individuo muerto.

*LagVM: El día 17/11/2017, a los 11 días de comenzado el experimento, se registró el 10% de mortalidad correspondiente a la concentración 75%. No se registra canibalismo para este caso.

a)



b)



Figura 32. a) Comienzo del experimento de ANPHITOX. b) Acondicionamiento de cordones para luego seleccionar las larvas que se encontraban en el estadio de interés para el experimento (en m y m).

Ambos tratamientos no registraron signos de anomalías morfológicas, ni en el disco oral ni en el resto del cuerpo. Sin embargo, su desarrollo fue menor en relación a los otros tratamientos.

El resto de las larvas sobrevivieron hasta finalizar el experimento. Todas ellas fueron depositadas y conservadas en formol al 5% para luego analizar anomalías morfológicas.

-Desaparición de branquias externas:

La desaparición de las branquias externas se registró el día 13/11/2017, a los 7 días de comenzado el experimento.

Esta información es de suma importancia, ya que nos permite asociar directamente la mortalidad de las larvas con la calidad de las lagunas. Aquí es cuando comienzan a moverse y por ende a buscar comida dado el desarrollo de su disco oral (Figura 33).

Vinculado a la mortalidad mencionada en el primer ítem, la mortalidad se dio posteriormente al desarrollo del disco oral.

a)



b)



Figura 33. Aplicación de alimento dado su movilidad. a) Estante con varias concentraciones. b) Vista más cercana de larvas en movimiento.

-Inmovilidad o movimientos anormales:

Este dato fue registrado apenas comenzaron a movilizarse y a alimentarse (Días: 7 y 10 de comenzado el experimento). Y dado que la mortalidad fue baja, resulta de suma importancia registrarlo debido a que pueden darnos signos de mala calidad de las lagunas sin directamente generar la muerte de los individuos. En la Tabla 23, se registran estas variables en los individuos.

Para el día 7 (13/11/2017) del experimento, se observa un mayor porcentaje de larvas inmóviles se registró en LagY, al 50%. Así como también el mayor porcentaje de boca arriba al 25%. Mientras que los movimientos circulares se registraron en las larvas al 75% de agua correspondiente a LagC (Figura 34).

Para el día 10 (17/11/2017) del experimento, se observa un mayor porcentaje de inmóviles al 100% de LagC, así como también de panzas hinchadas, solo que al 25%. Mientras que larvas boca arriba, el mayor porcentaje se registró al 50% de LagVM (Figura 35).

Tabla 23. Registros de inmovilidad y/o movimientos anormales durante el desarrollo del experimento AMPHITOX (Referencias: 1. Inmovilidad. 2. Nado hacia arriba 3. Nado en círculos. 4. Panza hinchada, LagBL=Laguna Brazo Largo, LagY=Laguna Yuyal, LagC=Laguna Canaleta, LagG=Laguna Gigante, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagS=Laguna Sur, C=Control).

%	LagBL				LagY				LagC				LagG				LagVM				LagS				C
	100	75	50	25	100	75	50	25	100	75	50	25	100	75	50	25	100	75	50	25	100	75	50	25	100
1	70	35	40	50	70	70	95	55	75	55	35	65	65	45	30	55	35	40	60	65	40	30	40	45	60
2	20	10	5	20	0	0	15	25	0	0	0	0	5	5	20	0	15	0	5	0	20	0	20	5	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	35	60	45	20	15	10	15	20	100	95	30	30	10	25	5	35	15	20	5	5	15	5	5	5	5
2	0	5	5	5	5	0	0	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	20	5	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

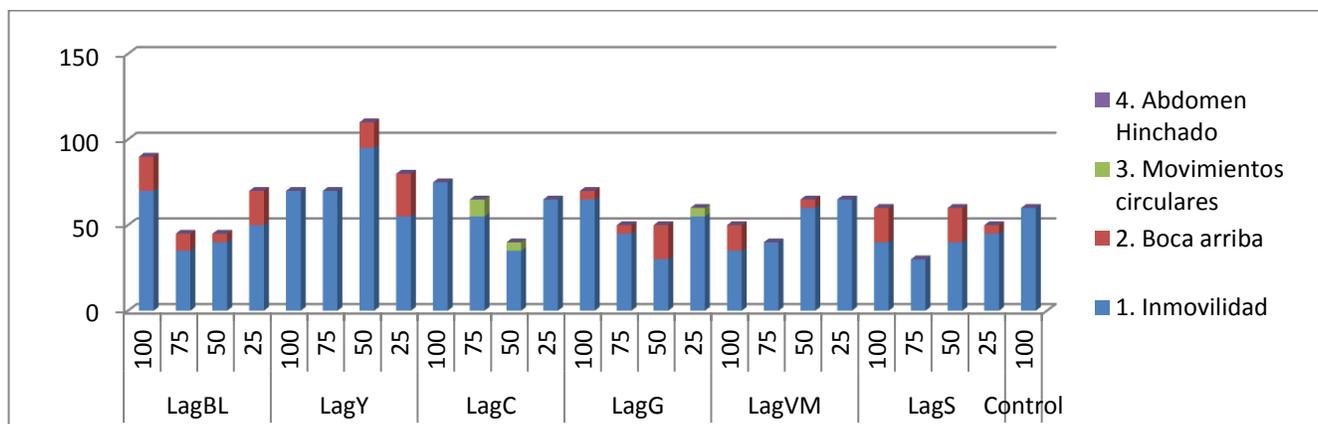


Figura 34. Gráfico de barras para los porcentajes de las distintas inmovilidades y/o movimientos anormales registradas durante el experimento (Día 13/11/2017) (Referencias: LagBL=Laguna Brazo Largo, LagY=Laguna Yuyal, LagC=Laguna Canaleta, LagG=Laguna Gigante, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagS=Laguna Sur).

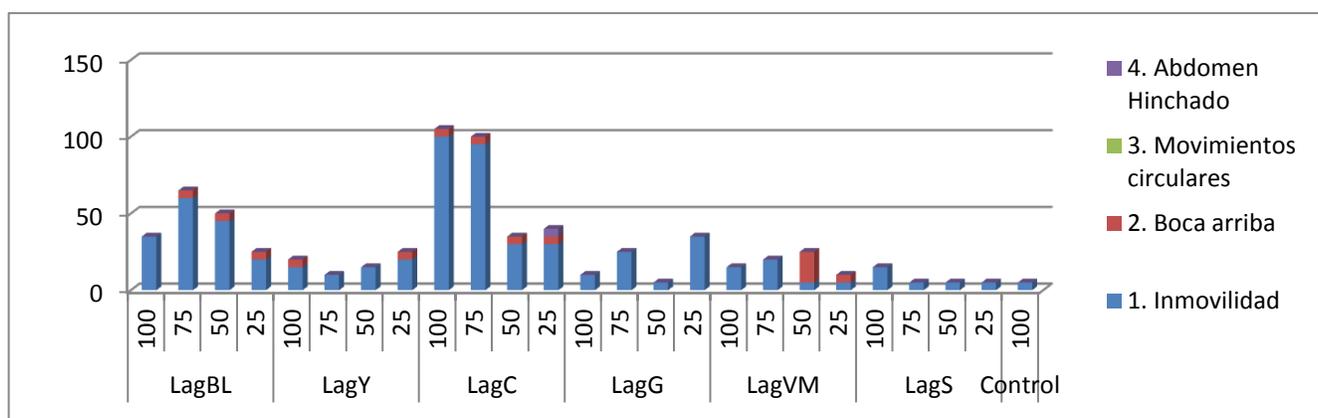


Figura 35. Gráfico de barras para los porcentajes de las distintas inmovilidades y/o movimientos anormales registradas durante el experimento (Día 17/11/2017) (Referencias: LagBL=Laguna Brazo Largo, LagY=Laguna Yuyal, LagC=Laguna Canaleta, LagG=Laguna Gigante, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagS=Laguna Sur).

-Mediciones de variables ambientales:

Dado que las condiciones de temperatura fueron controladas en el mismo laboratorio donde se realizaba el experimento, solo se midió el pH para los días en que fueron renovados los medios para todas las concentraciones (Tabla 24). En la Tabla 24 están representadas las mediciones de pH durante el desarrollo del experimento.

Tabla 24. Media de los pH registrados durante el experimento AMPHITOX (Referencias: LagBL=Laguna Brazo Largo, LagY=Laguna Yuyal, LagC=Laguna Canaleta, LagG=Laguna Gigante, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagS=Laguna Sur)

%	100	75	50	25
LagS	9,19±0,22	9,23±0,17	9,19±0,13	9,02±0,09
LagVM	9,15±0,15	9,17±0,06	9,12±0,07	8,93±0,14
LagG	8,80±0,21	8,79±0,17	8,79±0,21	8,60±0,04
LagC	8,95±0,21	9,00±0,19	8,93±0,17	8,82±0,04
LagBL	8,83±0,42	8,95±0,46	8,99±0,43	8,93±0,32
LagY	8,55±0,23	8,61±0,24	8,61±0,19	8,50±0,15
Control	8,35±0,38	8,35±0,38	8,35±0,38	8,35±0,38

-Finalización del experimento:

Al finalizar el experimento (Figura 36), se retiraron las larvas de cada una de las placas y se depositaron en Formol al 5%. Luego, se registró en la lupa la presencia de anomalías morfológicas, estadio, Largo total, Largo del cuerpo, ancho del cuerpo y peso. En la Figura 37 se muestran las medidas de longitud total en milímetros registrada en cada experiencia. El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas para la concentración de 100% (H=45.28 y $p<0.001$), 75% (H=26.68 y $p=0.002$) y 50% (H=27.83 y $p=0.001$). Mientras que para la concentración del 25% no se encontraron diferencias. Para la concentración de 100%, las menores longitudes totales se registraron para los individuos de LagVM y LagBL. Mientras que para las concentraciones de 75% y 50%, los individuos con menores longitudes totales fueron de LagVM y LagG (Figura 37).

a)

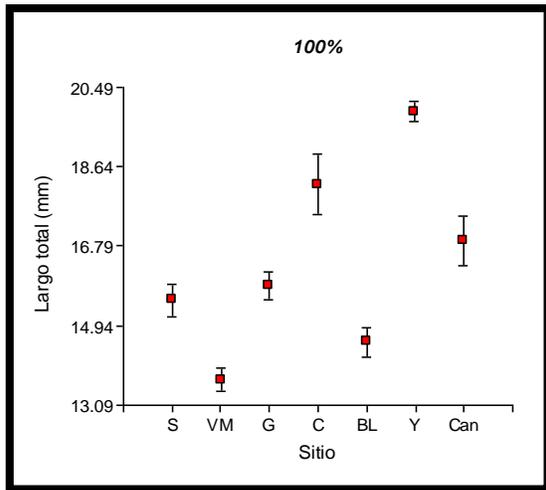


b)

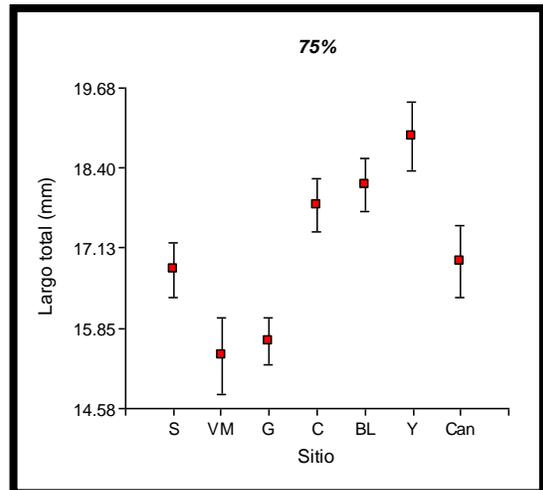


Figura 36. a) Recambio de aguas. b) Finalización del experimento.

a)



b)



c)

d)

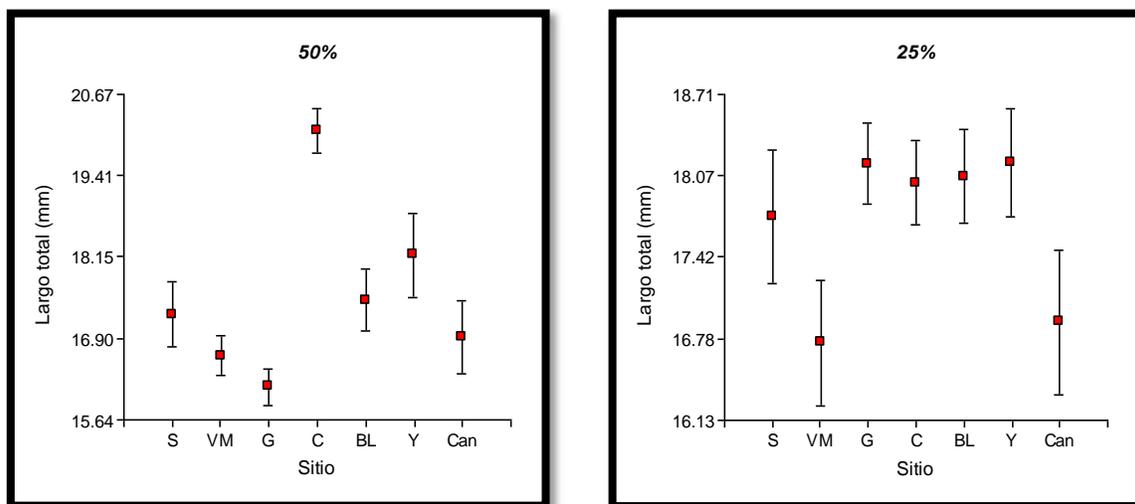


Figura 37. Gráficos de puntos para cada una de las concentraciones de las lagunas. a) 100%. b) 75%. c) 50%. d) 25% (Referencias: S=Laguna Sur, VM=Laguna Vaca Muerta, G=Laguna Gigante, C=Laguna Canaleta, BL=Laguna Brazo Largo, Y=Laguna Yuyal y Can=Control).

-Estadio:

En la concentración 100%, se observa que los individuos correspondientes a la LagVM se encontraban en los estadios 25 y 26, correspondiendo con los más pequeños respecto al resto de las lagunas. Mientras que, LagY presentó los individuos de mayores estadios (38, 39 y 40) (Figura 38).

Estadios (100%)

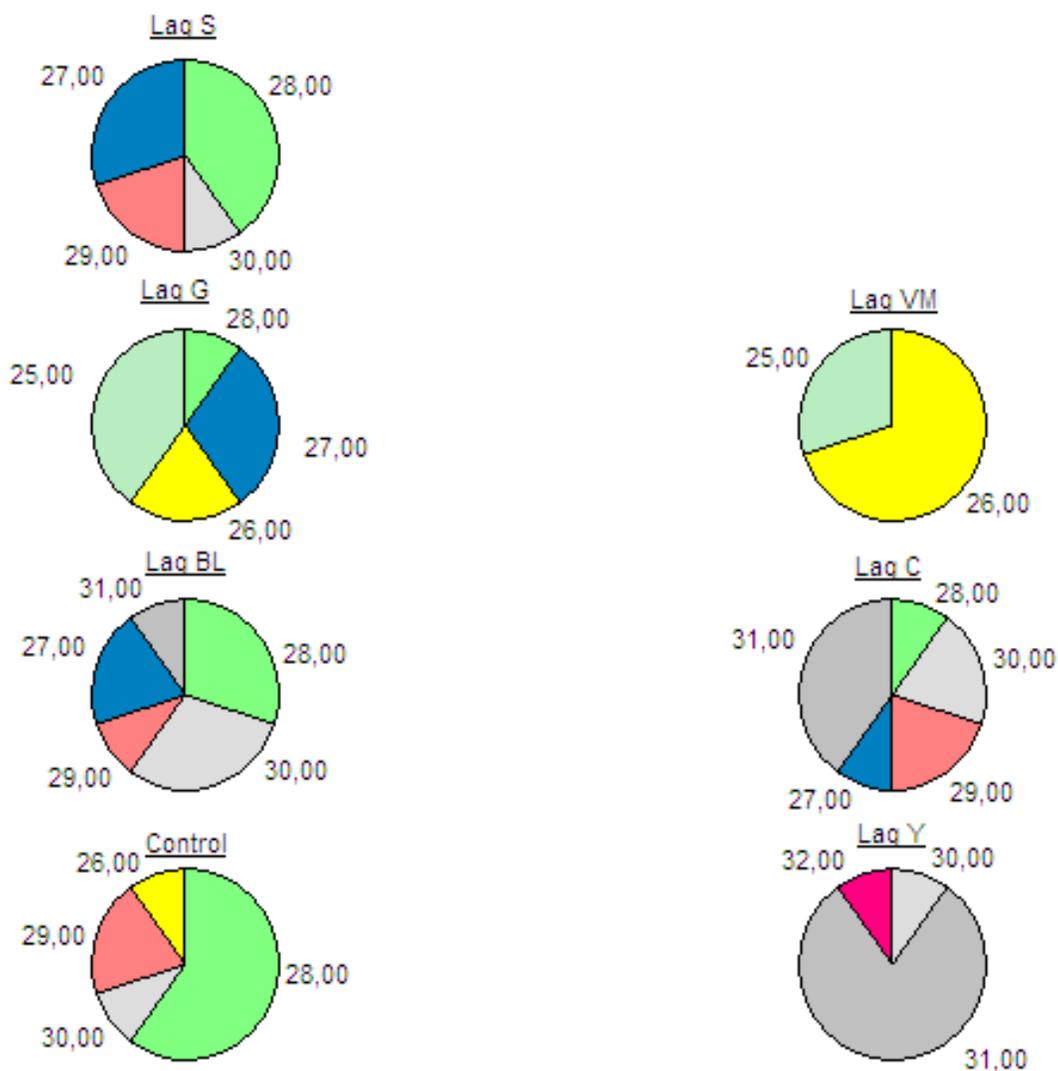


Figura 38. Porcentaje de individuos por estadio en cada una de las lagunas correspondiente a la concentración 100% (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).

Para la concentración de 75%, se observa que los individuos con menores estadios correspondían a LagG, sin embargo, los individuos de LagVM también tenían menores estadios. Con respecto a los individuos de mayores estadios, correspondió a LagY, igual a lo ocurrido en la concentración 100% (Figura 39).

Estadios (75%)

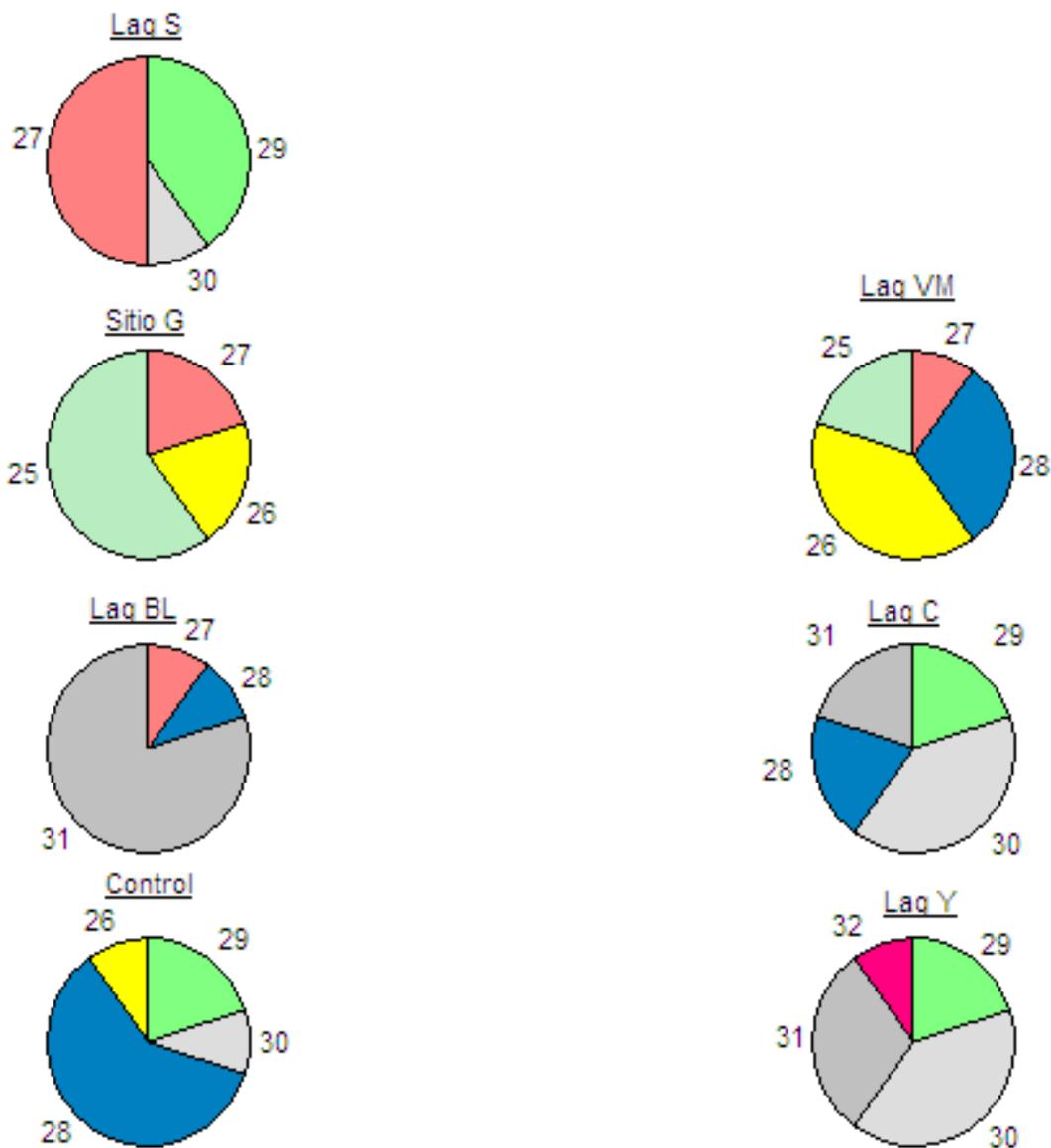


Figura 39. Porcentaje de individuos por estadio en cada una de las lagunas correspondiente a la concentración 75% (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).

Para la concentración 50%, LagVM presentó los estadios menores, mientras que LagY los mayores estadios (Figura 40).

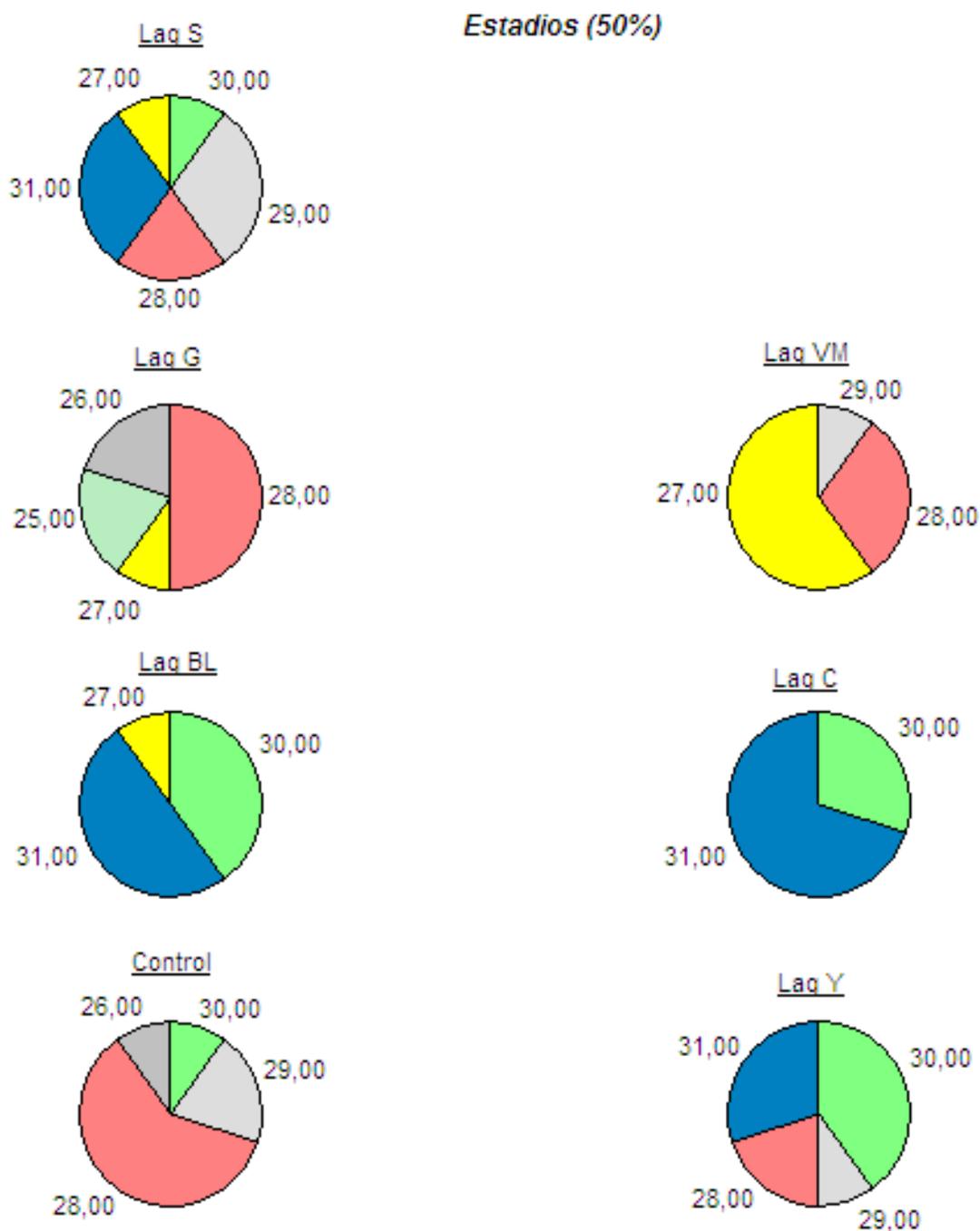


Figura 40. Porcentaje de individuos por estadio en cada una de las lagunas correspondiente a la concentración 50% (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).

Por último, si bien para la concentración 25% no existieron diferencias estadísticas significativas, se observa que LagVM presenta los individuos con menores estadios. Mientras que LagY, aquellos con mayores estadios (Figura 41).

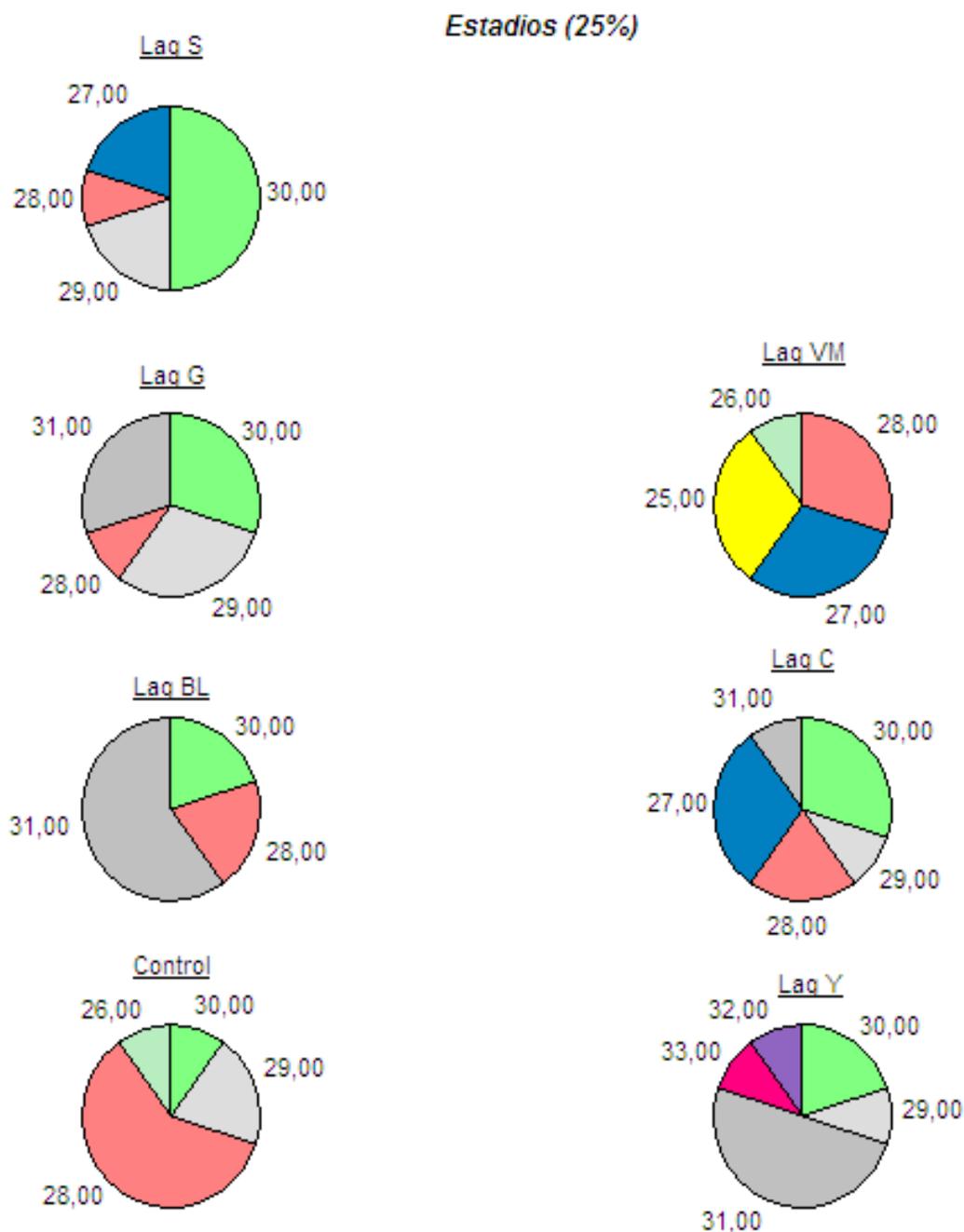


Figura 41. Porcentaje de individuos por estadio en cada una de las lagunas correspondiente a la concentración 25% (Referencias: LagS=Laguna Sur, LagVM=Laguna Vaca Muerta, LagG=Laguna Gigante, LagC=Laguna Canaleta, LagBL=Laguna Brazo Largo y LagY=Laguna Yuyal).

5. DISCUSIÓN

5.1. DISCUSIÓN

Actualmente las herramientas ecotoxicológicas, contribuyen a la integración de los indicadores químicos y biológicos, aportando una visión general de la calidad de un cuerpo de agua. Distintos análisis y ensayos son especialmente útiles como sistemas de alerta temprana para investigar las causas de un deterioro ecológico, lo que permite una mejor comprensión de las relaciones causa-efecto (Martinez Haro et al., 2014).

En el presente estudio, se caracterizó las lagunas asociadas a distintos manejos agrícola-ganaderos, situadas en agroecosistemas típicos del sureste de la provincia de Córdoba. Se generó un gradiente de perturbación para los sitios de muestreo, a los fines de evaluar el efecto a causa de la intensificación agrícola-ganadera. Como laguna más perturbada, resultó LagBL, seguido de LagVM, LagG, LagC, LagS y por último, LagY. De acuerdo al gradiente, las lagunas más afectadas por la intensidad agrícola, en términos de su calidad, son las asociadas a sistemas convencionales. Sin embargo, se observó que aquellas lagunas localizadas en sistemas orgánicos/convencionales resultaron las más perturbadas. Varios trabajos discuten acerca de la efectividad de los sistemas agrícolas orgánicos (Hole et al., 2005; Gunthier et al., 2014) para la conservación de los agroecosistemas. Esto se debe a que diversos autores y productores agrícolas sostienen que el uso de la tierra y la conservación de la biodiversidad han sido tradicionalmente vistos como incompatibles (Teja et al., 2010).

Los análisis ACP y CCA realizados con las variables ambientales y con las variables biológicas de los distintos sitios, separaron a las lagunas en dos grupos, las temporarias respecto las permanentes, para ambas estaciones (primavera-verano). De acuerdo a Quiroz et al., (2002) las lagunas pampeanas se pueden distinguir en dos grandes grupos, las lagunas “claras” y las “turbias”. Dicha clasificación se basó según variables ambientales tales como, turbidez, salinidad, conductividad, sólidos disueltos totales, geomorfología, régimen climático, drenajes y las modificaciones humanas en el uso de la tierra y el agua. Las lagunas “claras” son aquellas del tipo temporarias donde la estratificación no existe por su baja profundidad. Mientras que lagunas “turbias”, serían aquellas del tipo permanente donde la estratificación es más notoria. Por lo tanto, LagC y LagY son clasificadas como

claras, por ser temporarias y por tener un impacto menor asociado a la actividad antrópica, mientras que LagBL, LagVM, LagS y LagG son agrupadas como turbias por ser permanentes y con un mayor efecto por parte de las actividades humanas.

Los valores de las variables salinidad, sólidos disueltos totales y conductividad para LagY y LagC, en ambas estaciones de muestreo, fueron muy altos. De acuerdo a la OMS, la CEE (Comunidad Económica Europea) establece para la conductividad un valor guía para el agua potable de $400 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ (OMS 2004). Nuestros resultados registraron valores $1049 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ y $1405 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ en primavera y verano, respectivamente. Según las características de la cuenca, los altos valores de conductividad registrados por nosotros, indicarían procesos de mineralización, que podrían ser causado por las actividades antropogénicas en estos sitios (Gatica et al., 2012; Nori et al., 2013; Babini et al., 2018). Esto sería válido para ambas lagunas, debido a que LagC recibe aportes por escorrentía de todos los campos colindantes. Mientras que LagY presenta conexión, durante los periodos de mayores lluvias con la laguna “Las Tunas” ubicada dentro de la reserva provincial Las Dos Hermanas, la cual se asocia a varios campos donde se practica agricultura intensiva.

En cuanto al arsénico y el flúor, los valores registrados para LagS y LagVM estuvieron por encima de lo permitido ($111\text{mg}/\text{L}$ de As y $8.70\text{mg}/\text{L}$ de F), según la CEE recomienda concentraciones de $0.7\text{-}1.7 \text{mg}/\text{L}$ para el F- y de $0.01 \text{mg}/\text{L}$ para el As-. Esto podría deberse a que la calidad de las aguas superficiales en el Sureste de Córdoba se ve notoriamente afectada por el gradiente salino propio de la cuenca, con altos contenidos de As- y F-. La presencia de estos oligoelementos está condicionada por factores naturales y derivarían de componentes piroclásticos del loess, por meteorización del vidrio volcánico presente en el mismo (Nicolli et al., 1985; Villalba, 1999; Cabrera & Blarasin, 2001; Smedley, 2002).

Las lagunas LagBL y LagC presentaron altas concentraciones de fosfatos (PO_4^{3-}) durante el verano (LagBL= $23.30\text{mg}/\text{L}$, LagVM= $12\text{mg}/\text{L}$ y LagC= $11.60\text{mg}/\text{L}$) muy por encima de lo permitido por la CEE ($0.7 \text{mg}/\text{l}$). Los fosfatos conjuntamente con los nitratos son los principales componentes de los agroquímicos (plaguicidas y fertilizantes) y su elevada concentración nos indicaría una probable perturbación debido a la actividad agrícola-ganadera (Camargo & Alonso, 2008; Giuliano & Blarasin, 2013). Los herbicidas o pesticidas organofosforados utilizados en la agricultura aplicados en altas concentraciones, pueden afectar al agua que se utiliza para riego agrícola (Lavie et al., 2010; Rodriguez et

al., 2017). Concentraciones de fosfato superiores a 0.1 mg L⁻¹ favorecen los procesos de eutrofización y disminuye el oxígeno disuelto en los cuerpos de agua (DOF, 1989; Macleod & Haygarth, 2003). Esto también podría explicar el bajo oxígeno en LagBL (30.3 ppm) durante la primavera. Es importante recordar que LagBL es un cuerpo de agua afectada por escorrentías, drenajes superficiales desde el nivel freático y canales artificiales. Todos estos procesos, generan movimientos de gran cantidad de sustancias. Muchos productos químicos utilizados en la agricultura pueden llegar a contaminar los cuerpos de agua a causa de los procesos antes mencionados afectando los ecosistemas acuáticos (Knutson et al., 2004; Alford et al., 2001; Kiesecker et al., 2001; Cabagna et al., 2005; De Sá, 2005; Salinas et al., 2015).

Los nitratos (NO₃) también registraron valores elevados por encima de los permitidos por la OMS (1mg/L) para LagBL (1.33mg/L) y LagC (1.50 mg/L) durante el verano. Los aportes al ambiente de nitratos y fosfatos, se han duplicado y triplicado en los últimos años (Hole et al., 2005), como producto del modelo de intensificación de la agricultura en Argentina, que demanda cada vez más insumos químicos, menos diversificación y dependencia de nuevas tecnologías (Pengue, 2004). Por ello, altas concentraciones de nitrato y fosfato son indicadores de contaminación por actividad agropecuaria y se utilizan como indicadores de la calidad del agua en numerosos estudios (Sánchez de Fuentes, 2000; Perdomo et al., 2001; Blanco et al., 2004; Arumi et al., 2007; Camargo & Alonso, 2008; Herrero & Gil, 2008).

El ión cloruro (Cl⁻) se registró como la variable más significativa en LagG para la estación de verano (519.40mg/L). Se sabe que el ganado no solo genera modificación de márgenes de las lagunas por pisoteo, sino también hay un aporte de distintas sustancias producto de la acumulación de excremento (Herrero & Gil, 2008). Entre las sustancias, se mencionan a los cloruros y nitratos. Los contaminantes presentes en las excretas son diversos y pueden ingresar a los cuerpos de agua por diferentes vías. Llegan a aguas superficiales (lagos, lagunas y humedales o ríos) por escurrimiento, desde corrales y terrenos fertilizados con estiércol, por desborde de lagunas por lluvias torrenciales, y por deposición atmosférica (Galindo et al., 2004; Burkholder et al., 2007). Las concentraciones máximas aceptables recomendadas por la EPA son de 250 mg/L de cloruros, sin embargo, en LagG se registraron valores superiores (primavera= 277mg/L y verano= 519mg/L). La

actividad ganadera se trata de otro factor además de los sistemas agrícolas utilizados en cada lote asociado a las lagunas afectadas. Particularmente en LagG, la presencia de ganado se dio en ambas estaciones y en todas las temporadas de muestreo. Esto explicaría el gran aporte de sustancias como cloruros en estos sitios.

Stahl, (1997) definió a los organismos centinela como "cualquier organismo no humano que pueda reaccionar a un contaminante ambiental antes de que el contaminante afecte a los humanos". Para la detección de perturbaciones locales, estos organismos deben ser abundantes en el área de estudio, tener una baja tasa de migración y limitarse a un espacio pequeño (Flickinger & Nichols, 1990). Además, se ha observado que las especies pueden responder de manera diferente no solo al clima, sino también a la ocurrencia de disturbios (Pineda & Halffter, 2004). Las prácticas agrícolas pueden considerarse como perturbaciones dentro de las tierras de cultivo (Zhao & Neher, 2013). Sin embargo, numerosas especies de anfibios han sido capaces de persistir en paisajes agrícolas de todo el mundo a pesar de las profundas modificaciones inherentes a esta actividad (Agostini, 2013; Babini et al., 2018). *Rhinella arenarum* y *Leptodactylus latrans* por sus historias de vida cumplen con los requisitos de especie bioindicadora.

La evaluación de la calidad del medio ambiente, en particular los ecosistemas acuáticos, se ha basado tradicionalmente a través de mediciones físico químicas del agua. En la actualidad se ha complementado con otras técnicas biológicas que permiten predecir el efecto de la exposición a la mezcla de xenobióticos en bajas concentraciones (Palma Acuña, 2005; Quesada García et al., 2013).

Los glóbulos rojos en anfibios son nucleados; por lo tanto pasan por sucesivas divisiones celulares en la circulación (Duellman & Trueb, 1994) lo que los convierte en un material adecuado para los ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad (Pollo et al., 2017). El Test de Micronúcleos (Bly et al., 2004) y Anormalidades Nucleares Eritrocitarias (da Silva Souza & Fontanelli, 2006; Marques et al., 2009; Guilherme et al., 2008) son capaces de reflejar una medida de exposición temprana a un contaminante (Pollo et al., 2017), al igual que las alteraciones en la dinámica eritropoyética. Por tal motivo, dichos biomarcadores asociados a eritrocitos de anuros son útiles para conocer la relación entre los organismos y su medio, y con ello la salud del ambiente (Hoffman et al., 2003).

Los individuos de *R. arenarum* de LagC presentaron mayor frecuencia de Anormalidades Genotóxicas Totales. Como ha sido indicado oportunamente, LagC, presenta altos valores de conductividad, fosfatos y nitratos, a consecuencia de los aportes de las sustancias provenientes de diferentes campos, producto de la estrecha relación con los procesos propios del ciclo hidrológico del agua y sumado a la presencia de canales artificiales. Los registros de conductividad, fosfatos y nitratos también han sido citados por otros autores con efectos variados sobre los anfibios (Babini et al., 2015; Babini et al., 2018; Bionda et al., 2018).

Los resultados de las Anormalidades Citotóxicas Totales para los individuos de la *R. arenarum* de LagVM y LagS, resultaron elevados para ambas lagunas, con altos valores As- y F-. El arsénico puede dañar los centros hematopoyéticos y por lo tanto la producción de células sanguíneas (Castro, 1982; Pedlar et al. 2002; Prieto García et al. 2007). El flúor ha sido reportado como un inhibidor de la actividad enzimática (Barbier et al., 2010) causando múltiples efectos a nivel celular cuando las concentraciones superan los 0.5 mg F/L en diferentes organismos acuáticos (Camargo et al., 2003; Goh & Neff, 2003; Cao et al., 2013; Pollo et al., 2017). Una elevada frecuencia de eritrocitos inmaduros registradas en este estudio en *Rhinella arenarum*, podría ser una respuesta al estrés (Valenzuela et al., 2006; Pollo et al., 2017) causado por la presencia de contaminantes (Prieto et al., 2008) o a la presencia de parásitos que inducen regeneración celular.

Los individuos de *L. latrans* de LagY, registraron mayores frecuencias de Anormalidades Genotóxicas Totales. Si bien esta laguna resulta una de las menos afectadas por la intensificación agrícola-ganadera, esto podría deberse a que esta laguna (LagY) en periodos de mayores lluvias se conecta con una laguna inmersa en una matriz agrícola ganadera (Laguna Las Tunas). Y como se sabe esta actividad induce a ANE y Mn (Babini et al., 2015; Babini et al., 2018; Bionda et al., 2018). Las relaciones negativas entre la actividad agrícola y las poblaciones de anfibios han sido reportadas desde más de dos décadas (Berger, 1989).

Para los biomarcadores citotóxicos, los individuos de *L. latrans* de LagS y LagC presentaron los valores más altos de Anormalidades Citotóxicas Totales. Ambas lagunas, dentro del gradiente de perturbación, son las afectadas “medianamente” por la intensificación agrícola-ganadera. De acuerdo a Barni et al., (2007), en condiciones de

contaminación ambiental, surge una respuesta intensa a la mayor necesidad de reemplazar células eritrocíticas dañadas por células nuevas, y de cambiar la tensión de oxígeno y dióxido de carbono, es una típica respuesta por parte del organismo. La presencia de células anucleadas de glóbulos rojos en los individuos de las lagunas afectadas puede representar un mecanismo especial para aumentar la eficiencia de transporte de oxígeno, en particular en condiciones de contaminación del agua o condiciones físicas no apropiadas para su disponibilidad, mejorando la relación superficie/volumen de la célula (Barni et al., 2007).

Los cambios en los parámetros sanguíneos pueden ser útiles en algunas especies como marcadores bioquímicos (Haratym-Maj, 2002). Entre los anfibios anuros, el recuento diferencial de glóbulos blancos representa una alerta temprana de exposición a distintos agentes contaminantes antes de que puedan ser detectadas respuestas a otros niveles de organización (Peri et al., 1998; Davis et al., 2004; Salinas et al., 2015).

Se han observado altos porcentajes de linfocitos para los individuos de LagBL y LagC para ambas especies. Cabagna et al., 2005 registra mayores frecuencias de linfocitos para individuos en campos intensivos. De acuerdo a Zhelev, (2007) la mayoría de los agentes contaminantes estimulan la rama linfoide. El impacto de las enfermedades crónicas como consecuencia de la exposición de anfibios a plaguicidas es un factor que puede contribuir a la disminución de las poblaciones en ambientes naturales y rurales (Carey et al., 1999; Salinas, 2012).

Los neutrófilos son los principales leucocitos fagocíticos, que responden a inflamaciones, estrés o infecciones (Cabagna et al., 2005). Peskova, (2001) destaca que una neutropenia pueden ser resultado de una corta exposición a tóxicos muy concentrados y también considerada un tipo patológico con un posible resultado letal. Nuestros resultados mostraron porcentajes muy bajos para ambas especies, en LagBL, LagC y LagVM respecto al resto de las lagunas. Se ha demostrado que la exposición a plaguicidas provoca alteraciones en la función inmune de los anfibios haciendo a los individuos más vulnerables (Carey et al., 1999; Arikian, 2010; Salinas, 2012; Salinas et al., 2015). Cabagna et al., 2005 registró un porcentaje menor de neutrófilos para uno de sus sitios de muestreo, donde se realizaban prácticas de producción agrícola intensiva con soja transgénica. Klucinski et al., (1996) encontró, en seres humanos expuestos a pesticidas líquidos, una disminución significativa en el número de neutrófilos.

Los eosinófilos están involucrados en la respuesta inmune ante parásitos (Kiesecker, 2002; Thrall, 2004; Davis & Durso, 2009). La supresión del número de eosinófilos por pesticidas, aumenta la susceptibilidad de una especie a infecciones generadas por trematodos (Kiesecker, 2002). Nuestros resultados mostraron una disminución del porcentaje de eosinófilos. Al igual que lo registrado por Cabagna et al., (2005) que estuvo asociado a un cultivo intensivo con soja transgénica.

En cuanto a los basófilos, si bien no está claro su papel en el sistema inmune, por razones desconocidas su abundancia varía entre las especies de anfibios en todo el mundo, desde el 57%, como es el caso del tritón japonés *Cynops pyrrhogaster* (Pfeiffer et al., 1990) al 1% en *Bufo alvarius* (Cannon & Cannon, 1979). El papel de este tipo de leucocito parece crucial en la metamorfosis de anfibios anuros debido que durante el desarrollo se incrementa hasta llegar adulto (Davis et al., 2009). Los individuos de ambas especies estudiadas presentaron valores mayores a los registrados en otros trabajos (LagVM= 7.61%), bajo la misma actividad agrícola-ganadera (Salinas et al., 2015). Szubartowska et al., (1990) registró un aumento de basófilos en *Rana esculenta*, expuesta a altas dosis de agentes tóxicos. Estos valores aparentemente reflejan flexibilidad de las respuestas compensatorias del sistema inmune en anfibios que viven en ambientes contaminados.

Las anomalías morfológicas en el desarrollo ocurren de manera natural en todos los seres vivos. En anfibios, el nivel basal de ocurrencia natural se encuentra por debajo del 5% de la población (Read, 1997; Phia et al., 2006; Johnson & Bowerman, 2010). Bionda et al., 2012 registró para *Rhinella arenarum* una frecuencia total del 13.64%, valor por encima del registrado en este estudio (6.97% para LagVM y 1.35% para LagS). Para *Leptodactylus latrans*, se registró una frecuencia total del 2%, inferior al nivel basal de ocurrencia natural (Read, 1997 (Nancy mail). Numerosas causas de la ocurrencia de anomalías han sido propuestas, entre ellas se encuentran, enfermedades parasitarias (Sessions & Ruth 1990; Johnson et al., 1999, 2004), predación (Eaton et al., 2004; Ballengée & Sessions 2009), radiación ultravioleta (UV-B) (Ankley et al., 2000, 2002), y agroquímicos (Gardiner & Hoppe 1999; Taylor et al., 2005; Skelly et al., 2007; Lannoo, 2008) Peltzer et al., 2011. Nuestros resultados indicarían que la prevalencia de las anomalías encontradas es mayor en LagVM, en relación a LagS siendo la primera un sitio de mayor perturbación. El

desarrollo de anomalías podrían generar impactos negativos en la viabilidad a largo plazo de las poblaciones de *R. arenarum* y *L. latrans*.

Las medidas del cuerpo de un individuo son importantes características demográficas (Peters, 1983 (Nancy mail)). El tamaño y peso pueden influir en otras características tales como tasas metabólicas, tasas de crecimiento y locomoción, y determinar atributos poblacionales como la abundancia o la densidad (McCoy et al., 2003; Mensie et al., 2008 (Nancy mail)). Las hembras de *R. arenarum* de LagVM presentaron un mayor peso en comparación a las hembras del resto de las lagunas coincidiendo probablemente con una mayor abundancia de insectos asociados a los cuerpos en descomposición de ganado vacuno. Pollo et al., (2017) registró un mayor peso para hembras presentes en ambientes lénticos altamente modificados. Un mayor peso no significa que los individuos posean un mejor estado de salud sino mayor disponibilidad de alimento (Polo Cavia et al., 2010). Sin embargo, no necesariamente es el ambiente más apropiado, ya que los individuos pueden estar expuestos a varios factores de estrés como: xenobióticos, parásitos, competidores, presencia humana, entre otros (Pollo et al., 2017). Cita Nancy

L. latrans presentó juveniles de menor tamaño en LagVM y LagS. Esto podría deberse a una inhibición del crecimiento ocurrido durante el transcurso del ciclo larval. Como regla general, la metamorfosis está regulada por la hormona tiroidea (Brown & Cai, 2007). Los agrotóxicos pueden causar inhibición de la actividad tiroidea, reduciendo el tiempo a la metamorfosis (Yang et al., 2005; Helbing & Ovaska, 2006). Además, la actividad tiroidea puede estar inducida por estrés (Denver, 1997), con lo cual podría esperarse que independientemente del tipo de xenobiótico, las larvas completen su ciclo en menos tiempo. Esta suposición se basa en el conocido mecanismo de plasticidad fenotípica característico de larvas de anfibios, por el cual los individuos pueden acelerar su desarrollo y alcanzar en menor tiempo a la metamorfosis cuando se encuentran en ambientes desfavorables (Alford & Harris, 1988; Bridges, 2005). Por lo tanto, las larvas llegarían a la metamorfosis, con tamaños y pesos por debajo de los estándares de salud, afectando el desarrollo y crecimiento de los futuros juveniles (Taigen & Pough, 1985; Gray & Smith, 2005) Nancy.

El ensayo de AMPHITOX permitió demostrar el efecto que produjo el agua de las lagunas sobre los parámetros registrados en larvas de *Rhinella arenarum*. Los resultados obtenidos indicaron que los individuos de LagVM mostraron efectos subletales adversos en

el 75% de concentración, alteraciones en el comportamiento durante el experimento, y menor longitud total de las larvas al finalizar el experimento (100%, 75% y 50%). Este último, se asoció a los menores estadios registrados para el mismo sitio (LagVM). De acuerdo a Pollo et al., (2017), las variables que pueden responder aumentando o disminuyendo en respuesta a un cambio son peso y longitud (Reading & Clarke, 1995). El tamaño final de los individuos es muy importante, porque repercute en la población de adultos, ya que poblaciones con individuos en promedio más pequeños tienen mayores probabilidades de declinación, que las compuestas por individuos de tamaños más grandes (Gray & Smith, 2005).

Con respecto al comportamiento, las alteraciones registradas, afectarían la sobrevivencia de los renacuajos, alterando la capacidad de escape y efectividad ante los depredadores. Los efectos negativos de los comportamiento pueden ser explicados por los cambios morfológicos de la cola y otras anomalías que se presentaron (Barth & Wilson, 2010; Martínez, 2006; Arenas Rodríguez, 2014).

Las pruebas en condiciones experimentales, tal como el test de AMPHITOX (Herkovits & Perez-Coll, 1999), no siempre reflejan lo que ocurre en condiciones naturales (Linder et al., 2010). Ya que se ha demostrado que los distintos factores ambientales interactúan con los xenobióticos pudiendo determinar efectos sinérgicos (Tsui & Chu, 2003; Chen et al., 2004; Wojtaszek et al., 2004) o alterar las condiciones de los sistemas acuáticos generando efectos indirectos (Boone & Semlitsch, 2002; Rohr & Crumrine, 2005; Clements & Rohr, 2009; 137,140 mail (Simms, 1969; Baringa, 1990).

5.2 Conclusión

Los resultados actuales proporcionan los primeros datos sobre la influencia que ejerce el tipo de manejo agrícola-ganadero sobre la salud de los anfibios anuros en agroecosistemas del sureste de la provincia de Córdoba, con la intención de comparar agricultura orgánica con convencional. Sin embargo, un sistema perturbado, tal como lo es un agroecosistema, con monocultivos y actividades ganaderas sostenidas en las últimas décadas, presentan múltiples factores de estrés y no permite concluir que la utilización de xenobióticos sean el único factor inductor de los efectos sobre la salud de los individuos que forman las

poblaciones de *R. arenarum* y *L. latrans*. Futuras investigaciones resultarían necesarias para completar la relación entre causa y efectos de la intensificación agrícola-ganadera sobre cualquier nivel de organización biológica.

De acuerdo a los resultados del presente estudio la calidad de las lagunas se ha comportado independientemente al tipo de manejo agrícola asociado. Sin embargo, se debe alertar acerca de una emergencia ambiental debido a que el uso desmedido de agroquímicos en cultivos convencionales están comprometiendo el estado general de la salud de los agroecosistemas a futuro. Debemos de replantearnos si nuestro sistema actual de agricultura es realmente sustentable, y en su defecto, actuar de inmediato para modificarlo por políticas ambientales que aseguren su recuperación, restauración y permanencia en el tiempo.

5.3. Recomendaciones

Debido a que el efecto sobre la calidad de las lagunas no está influenciado netamente a las actividades agrícola-ganaderas, es necesario ampliar estudios asociados a las características de dichas lagunas. Particularmente los anfibios anuros como centinelas de ambientes poluídos, para este estudio demostraron ser buenos indicadores de que las lagunas no responden solamente al tipo de manejo sino a diversos factores naturales y antrópicos típicos de la zona.

Sería de suma importancia evaluar también el estado poblacional de estas especies analizando parámetros ecológicos tales como reclutamiento, edad, dieta de adultos, riqueza de ensamble de anfibios, entre otras permitirán obtener una visión más general y holística del estado de conservación de los anfibios que habitan esta región

Finalmente, se deben continuar con los monitoreos ampliando no solo el seguimiento de otras especies de anuros sino también al resto de los vertebrados presentes en los agroecosistemas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostini, M.G. & P.A. Burrowes. 2015. Infection patterns of the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on anuran assemblages in agro-ecosystems from Buenos Aires Province, Argentina. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*. 14(2): 113-126.
- Agostini, M.G.; Kacoliris, F.; Demetrio, P.; Natale, G.; Bonetto, C. & A.E. Ronco. 2013. Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems from Northeastern of Buenos Aires province, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* DOI: 10.3354/dao02592.
- Alford, R.A., Harris, R.N. 1988. Effects of larval growth history on anuran metamorphosis. *American Naturalist* 131: 91-106.
- Alford, R. & S. Richards. 1999. Global Amphibian Declines: A Problem in Applied Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30: 133-165.
- Alford, R.A., Dixon, P.M., Pechmann, J.H. 2001. Global amphibian population declines. *Nature* 414: 449-500.
- Altieri, M., & C. Nichols. 1999. Agricultura tradicional y la conservación de la biodiversidad. *Biodiversidad y uso de la tierra*.
- Altieri, M.A. 1987. *Agroecology: The scientific basis of alternative agriculture*. Westview Press, Boulder.
- Altig, R.; Whiles, M.R. & C.L. Taylor. 2007. What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats. *Freshwater Biol.* 52: 386-395.
- Ankley, G.T., Diamond, S.A., Tietge, J.E., Holcombe, G.W., Jensen, K.M., DeFoe, D.L. & Perterson, R. 2002. Assessment of the risk of solar ultraviolet radiation to amphibians. I. Dose-dependent induction of hind limb malformations in Northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Environ. Sci. Technol.* 36, 2853–2858.
- Ankley, G.T., J.E. Tietge, G.W. Holcombe, D.L. DeFoe, S.A. Diamond, K.M. Jensen, and S.J. Degitz. 2000. Effects of laboratory ultraviolet radiation and natural sunlight on survival and development of *Rana pipiens*. *Canadian Journal of Zoology* 78:1092–1100.
- APHA. 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington: American Public Health Association.
- APHA-AWWA-WPCF. *Métodos de Normalización para Análisis de Aguas Potables y Residuales*. Ediciones DIASDESANTOS.
- Arenas Rodríguez, A. 2014. Efectos letales y subletales en embriones y renacuajos de anuros expuestos a Ph ácidos y básicos. Trabajo de grado para optar el Título de Magíster en Ciencias Biológicas Universidad del Tolima Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias Biológicas Ibagué, 123 paginas.
- Argencert. 2014. Servicio Internacionales de Certificación. <http://argencert.com.ar/sitio/>
- Arikan, H. 2010. A study on the blood cells of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. (Anura: Bombinatoridae). *Animal Biology* 60: 61–68.
- Aronoff, S. 1991. *Geographic Information Systems. A management perspective*. WDL Publications. Canadá.
- Arumi, J.L.; Núñez, J.; Salgado, L. & M. Claret. 2007. Evaluación del riesgo de contaminación con nitrato de pozos de suministro de agua potable rural en Chile. *Revista de Panamá en Salud Pública*. 20: 385–392.
- Attademo, A.M. 2010. Diversidad de anfibios (Amphibia: Anura) en cultivos de soja de la República Argentina: implicaciones en el control biológico de plagas.

- Attademo, A.M.; Lorenzón, R.E.; Peltzer, P.M. & C.R Lajmanovich. 2018. Diversity of Anurans in Rice Fields under Organic and Conventional Management in Santa Fe Province, Argentina. *Herpetological Review*, 2018, 49(4), 632–635.
- Babini, M.S. 2016. Aspectos ecológicos y demográficos de la metamorfosis de *Rhinella arenarum* como indicador de impacto ambiental en ecosistemas con perturbación agrícola-ganadera. Tesis doctoral en ciencias biológicas. 136p.
- Babini, M.S.; Bionda, C.L.; Salas, N.E. & A.L. Martino. 2015. Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 118: 118–125.
- Babini, M.S.; de Lourdes Bionda, C.; Salinas, Z.A.; Salas, N.E., & A.L. Martino. 2018. Reproductive endpoints of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae): Populations that persist in agroecosystems and their use for the environmental health assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*. 154: 294-301.
- Ballengée, B., and S.K. Sessions. 2009. Explanation for missing limbs in deformed amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 312:1–10.
- Barbier O., L. Arreola Mendoza y L.M. Del Razo. 2010. Molecular mechanisms of fluorite toxicity. *Chem-Biol Interact* 188: 319-333
- Barinaga, M. 1990. Where have all the froggies gone? *Science*. 247(4946): 1033-1035.
- Barni, S.; Boncompagni, A.E.; Grosso, V.; Bertone, I.; Freitas, Fasola M. & C. Fenoglio. 2007. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to Chemicals stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquat. Toxicol.* 81: 45-54.
- Barnosky, A.D.; Matzke, N.; Tomiya, S.; Wogan, G.O.U.; Swartz, B.; Quental, T.B.; Marshall, C.; McGuire, J.L.; Lindsey, E.L. & M. Maguire. 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature*. 471:51-57.
- Barth, B. J. & Wilson, R. S. 2010. Life in Acid: Interactive effects of pH and natural organic acids on growth, development and locomotor performance of larval striped marsh frogs (*Limnodynastes peronii*). *The Journal of Experimental Biology*, 213, 1293-1300
- Bauder, T.A.; Waskom, R.M. & J.G. Davis. 2007. Irrigation Water Quality Criteria. Colorado State University Cooperative Extension (USA). 7/03. no.0.506. www.ext.colostate.edu
- Bedano, J.C. 2007. El rol de la mesofauna edáfica en la evaluación de la calidad del suelo. Thuar, A., F. Cassán & C. Olmedo. De la biología del suelo a la agricultura. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.
- Bedano, J.C.; Cantú, M.P. & M.E. Doucet. 2006. Influence of three different land management practices on soil mite (Arachnida: Acari) densities in relation to a natural soil. *Applied Soil Ecology*. 32(3): 293-304.
- Bedano, J.C.; Domínguez, A. & R. Arolfo. 2011. Assessment of soil biological degradation using mesofauna. *Soil and Tillage Research*, 117, 55-60.
- Bedano, J.C.; Domínguez, A.; Arolfo, R. & L.G. Wall. 2016. Efecto de las buenas prácticas agrícolas bajo la labranza cero en la basura y los invertebrados del suelo en áreas con diferentes tipos de suelo. *Investigación de suelos y labranza*. 158: 100-109.
- Beebee, T.J.C. & R.A. Griffiths. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biol. Cons.* 125: 271-285.
- Beecher, N.A.; Johnson, R.J.; Brandle, J.R.; Case, R.M. & L.J. Young. 2002. Agroecology of birds inorganic and nonorganic farmland. *Conservation Biology*. 16:1620-1631.

- Beja, P. & R. Alcazar. 2003. Conservation of Mediterranean temporary ponds under agricultural intensification: an evaluation using amphibians. *Biol. Conserv.* 114 (3): 317–326.
- Bengtsson, J.; Ahnström, J. & A. Weibull. 2005. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: A meta-analysis. *Journal of Applied Ecology*.42: 261-269.
- Benton, T.G.; Vickery, J.A. & J.D. Wilson. 2003. Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key? *Trends Ecol. Evol.* 18:182-188.
- Berger, L. 1989. Disappearance of amphibian larvae in the agricultural landscape. *Ecology International Bulletin*, 17, 65-73.
- Bilenca, D. & F. Miñarro. 2004. Identificación de áreas valiosas de pastizal (AVPs) en las pampas y campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil (No. 504.73 (8) BIL).
- Bionda, C.D.L., Babini, S., Martino, A.L., Salas, N.E., & Lajmanovich, R.C. 2018. Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation*, 14, e00398.
- Bionda, C.; Gari, N.; Luque, E.; Salas, N.; Lajmanovich, R. & A. Martino. 2012. Ecología trófica en larvas de *Rhinella arenarum* en agroecosistemas y sus posibles implicancias para la conservación. *Revista de Biología Tropical*. 60 (2): 771-779.
- Bionda, C.; Salas, N.; Caraffa, E.; Baraquet, M. & A. Martino. 2012. On abnormalities recorded in an urban population of *Rhinella arenarum* from central Argentina. *Herpetology Notes*. (5): 237-241.
- Bionda, C.D.L.; Kost, S.; Salas, N.E.; Lajmanovich, R.C.; Sinsch, U. & A.L. Martino. 2015. Age structure, growth and longevity in the common toad, *Rhinella arenarum*, from Argentina. *Acta Herpetologica*, 10 (1), 55-62.
- Bionda, C.L.; di Tada, I.E. & R.C. Lajmanovich. 2011. Composition of amphibian assemblages in agroecosystems from the central region of Argentina. *Russian Journal of Herpetology*. 18 (2): 93-98.
- Bishop, C.A.; Mahony, N.A.; Struger, J; Ng, P & K.E. Petti.1999. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River watershed, Ontario, Canada. *Environmental Monitoring and Assessment* 57: 21-43.
- Blanco, S.; Ector, L. & E. Becares. 2004. Epiphytic diatoms as water quality indicators in Spanish shallow lakes. *Vie et Milieu*. 54: 71–79.
- Blarasin, M.; Degiovanni S.; Cabrera A. & M. Villegas. 2005. Aguas superficiales y subterráneas en el Sur de Córdoba: una perspectiva geoambiental. ISBN 950-665-350-141 -1 52. Ed. UNRC.
- Blaustein, A.; Han, B.; Relyea, R.; Johnson, P.; Buck, J.; Gervasi, S. & L. Kats. 2011. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1223: 108-119.
- Blaustein, A.R. & J.M. Kiesecker. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecol. Lett.* 5:597-608.
- Blaustein, A.R. & P.T.J. Johnson. 2003. Explaining frog deformities. *Sci. Am.* 288: 60-65.
- Bly, B.L.; Knutson M.; Sandheinrich M.; Gray B. & D. Jobe. 2004. Flow cytometry used to assess genetic damage in frogs from farm ponds. *J. Iowa Acad Sc.*11:67-70.
- Bolognesi, C.; Bonatti, S.; Degan, V.; Gallerani, E.; Peluso, M. & M. Rabón. 1997. Genotoxic activity of glyphosate and technical formulation Roundup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1957-62.

- Boone, M.D., Semlitsch, R.D. 2002. Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. *Ecological Applications* 12: 307-316.
- Boone, M.D.; Davidson, C. & C.M. Briton. 2009. Evaluating the impact of pesticides in amphibian decline. En: Heatwole H, Williamson J (eds.) *Amphibian Decline: Diseases, Parasites, Maladies and Pollution*. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, Inglaterra pp 3183-3207.
- Boulding, D.R. & S.D. Klausner. 2002. Managing nutrients in manure: General principles and applications to dairy manure in New York (4). Pp. 65–88 en: Hatfield, JL & BA Steward (eds.). *Animal Waste Utilization: Effective use of manure as a soil resource*; 1a ed. Lewis Publishers.
- Brandolin, P.G & P.G. Blendinger. 2015. Effect of habitat and landscape structure on water bird abundance in wetlands of central Argentina. *Wetlands Ecol Manage DOI* 10.1007/s11273-015-9454-y.
- Bridges, C.M. 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 91-96.
- Brown, D.D., Cai, L.Q. 2007. Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology* 306: 20-33.
- Brühl, C.A.; Pieper, S. & B. Weber. 2011. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(11), 2465-2472.
- Brunetti, R.; Majone, F.; Gola, I. & C. Beltrame. 1988. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 44: 65–68.
- Burkholder, J.M., Tomasko, D.A., & Touchette, B.W. 2007. Seagrasses and eutrophication. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350(1-2), 46-72.
- Cabagna, M. C.; Lajmanovich, R. C.; Attedemo, A. M.; Peltzer, P. M.; Junges, C. M.; Biancucci, G. F. & A. Bassó. 2011. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *R. Revista Biológica Tropical*. Vol 59(1):17-28.
- Cabagna, M.; Lajmanovich, R.C.; Stringhini, G. & P.M. Peltzer. 2005. Hematological studies in the common toad (*Bufo arenarum*) in agrosystems of Argentina. *Applied Herpetol.* 2: 373-380.
- Cabrera, A. & M. Blarasin. 2001. Geoquímica del Flúor y Arsénico en el agua subterránea del sur de Córdoba, Argentina. En “Las Caras del agua subterránea”. Barcelona. España. Vol. 1, pág. 83-89, Cantero, J. J., C. Nuñez, O. Giayetto, & J. M. Cisneros.
1994. Composición florística y dinámica de pastizales naturales: propuesta de utilización. Estancia Las Dos Hermanas, Arias, Córdoba, Argentina.
- Camargo J.A. & A. Alonso. 2008. Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*. 16: 98-110.
- Camargo, J.A. 2003. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere*, 50(3), 251-264.
- Camargo, J.A. & A. Alonso. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International* 32: 831- 849.
- Cannon, M.S. & A.M. Cannon. 1979. The blood leukocytes of *Bufo alvarius*: a light, phase-contrast, and histochemical study. *Can J Zool* 57:314–322.

- Cantero, G. A.; Cantú, M.P.; Cisneros, J.M.; Cantero, J.J.; Blarasin, M.; Degioanni, A.; Gonzales, J.; Becerra, V.; Gil, H.; De Prada, J.; Degiovanni, S.; Cholaky, C.; Villegas, M.; Cabrera, A. & C. Eric. 1998. Las tierras y aguas del sur de Córdoba. Propuestas para un manejo sustentable. Universidad Nacional de Río Cuarto. 119p.
- Cao, J., J. Chena, J. Wanga, X. Wua, Y. Li y L. Xie. 2013. Tissue distributions of fluoride and its toxicity in the gills of a freshwater teleost, *Cyprinus carpio*. *Aquat Toxicol* 130-131: 68-76
- Carey, C. & C.J. Bryant. 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, Amphibian development, and decline of Amphibian populations. *Environ. Health Persp.* 103: 13-17.
- Charipper, H.A. 1928. Studies on the Arneith count. -XII. The effect of the injection of thyroid extract on the polynuclear count in a perennibranchiate amphibian (*Necturus maculosus*). *Exp. Physiol.* 19: 109-113.
- Carey, C.; Cohen, N. & L. Rollins-Smith. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Dev Comp Immunol* 23:459-472.
- Castro, J.A. 1982. Efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos del arsénico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 16(1), 3-17.
- Chen, C., Hathaway, K., Folt, C. 2004. Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4): 823-831.
- Chiesa, M.E.; Rosenberg, C.E.; Fink, N.E. & A. Salibián. 2006. Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae): effects of sublethal lead acetate. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 384-391.
- Clements, W.H., Rohr, J. 2009. Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9): 1789- 1800.
- Coda, J.; Gomez, D.; Steinmann A.R. & J. Priotto. 2015. Small mammals in farmlands of Argentina: Responses to organic and conventional farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 211: 17-23.
- Coda, J.; Gomez, D.; Steinmann, A.R. & J. Priotto. 2014. The effects of agricultural management on the reproductive activity of female rodents in Argentina. *Basic and Applied Ecology.* 15 (5): 407-415.
- Coda, J.A.; Gomez, D.; Steinmann, A. & J. Priotto. 2016. The use of fluctuating asymmetry as a measure of farming practices effects in rodents: A species-specific response. *Ecological Indicators.* 70: 269-275.
- Collins, J.P. & A. Storfer. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Divers. Distr.* 9:89-98.
- da Silva Souza, T. & C. Fontanetti. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alteration in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research* 605: 87-93.
- D'Acunto, C.W.; Gbelcova, H.; Festa, M. & T. Ruml. 2014. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. *Cellular signaling.* 26 (1): 173-178.
- D'Angelo, M.; Calderón, E. & F.S. Tabarache. 2009. Caracterización de los aspectos físicoquímicos y morfodinámicos de los diferentes sistemas fluviales vinculados a agroecosistemas en la zona de influencia del río La Caldera y sus afluentes (Salta, Argentina).

- Daruich, J.; Zirulnik, F. & M. Sofía Gimenez. 2001. Effect of the herbicide Glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetures. *Environmental Research*. 85: 226-231.
- Das, R.K. & N.K. Nanda. 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of the fish, *Heteropneustes fossilis*, by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutat.Res.* 175: 67-71.
- Davidson, C. 2004. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecol. Appl.* 14:1892-1902.
- Davis, A. K.; Cook, K. C. & S. Altizer. 2004. Leukocyte Profiles in Wild House Finches with and without *Mycoplasmal Conjunctivitis*, a Recently Emerged Bacterial Disease. *Eco Health*. 1: 362-373.
- Davis, A.K. & A.M. Durso. 2009. White blood cell differentials of northern cricket frogs (*Acris c. crepitans*) with a compilation of published values from other amphibians. *Herpetologica*, 65(3): 260-267.
- Davis, A.K. 2009. Metamorphosis-related changes in leukocyte profiles of larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Comp Clin Pathol* DOI 10.1007/s00580-008-0773-8.
- Davis, A.K.; Maney, D.L. & J.C. Maerz. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22: 760-772.
- de la Fuente, E.B.; Perelman, S. & C.M. Ghersa. 2010. Weed and arthropod communities in soyabean as related to crop productivity and land use in the Rolling Pampa, Argentina. *Weed Res.* 50, 561-571.
- De Sá. 2005. Crisis Global de Biodiversidad: Importancia de la Diversidad Genética y la Extinción de Anfibios. *Agrociencia*. Vol IX N°1 y N°2. Pág. 513-522.
- Denver, R.J. 1997. Environmental stress as a developmental cue: corticotropinreleasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Hormones and Behavior* 31: 169-179.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F., Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. & C.W. Robledo. 2017. Grupo InfoStat Professional, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina /<http://www.infostat.com.ar>S.
- di Tada, I.E.; Zavattieri, M.V.; Bridarolli, M.E.; Salas N.E. & A.L. Martino. 1996. Anfibios Anuros de la provincia de Córdoba, pp 191-215. En: Biodiversidad de la provincia de Córdoba. Fauna. Volumen I. di Tada I.E. y E.H. Bucher (eds). Universidad Nacional de Río Cuarto. 373 pp.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 1989. Criterios ecológicos de calidad del agua. CECCA001/89. 13 de diciembre. México. 7: 23.
- Domínguez, A.; Bedano, J.C. & A.R Becker. 2009. Cambios en la comunidad de lombrices de tierra (Annelida: Lumbricina) como consecuencia del uso de la técnica de siembra directa en el centro-sur de Córdoba, Argentina. *Ciencia del suelo*. 27(1): 11-19.
- Domínguez, A.; Bedano, J.C.; Becker, A.R. & R.V. Arolfo. 2014. Organic farming fosters agroecosystem functioning in Argentinian temperate soils: Evidence from litter decomposition and soil fauna. *Applied Soil Ecology*. 83: 170-176.
- Donald, P.F.; Green, R.E. & M.F. Heath. 2001. Agricultural intensification and the collapse of Europe's farmland bird populations. *Proc. R.Soc. Lond. B* 268:25-29.
- Drago, E. & R. Quirós. 1996. The hydrochemistry of the inland waters of Argentina: a review. *International Journal of Salt Lake Research*. 4: 315-325.
- Dritschilo, W. & D. Wanner. 1980. Ground beetle abundance in organic and conventional corn fields. *Environmental Entomology*. 9: 629-631.

- Duellman, W. E. & L. Trueb. 1994. Biology of amphibians. John Hopkins University Press, Baltimore, Md.
- Eaton BR, Eaves S, Stevens C, Puchniak A, Paszkowski CA. 2004. Deformity levels in wild populations of the wood frog *Rana sylvatica* in three ecoregions of western Canada. *J Herpetol* 38:283–287.
- Ergene, S.; Çavas, T.; Çelik, A.; Köleli, N.; Kaya, F. & A. Karahan. 2007. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*. 16: 385–391.
- Feder, M.E. & W.W. Burggren. 1992. Environmental Physiology of the Amphibians. The University of Chicago Press, Chicago, U.S.A.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*.455: 81-95.
- Fischer, J.; Manning, A.D.; Steffen, W.; Rose, D.B.; Daniell, K.; Felton, A.; Garnett, S.; Gilna, B.; Heinsohn, R. & D.B. Lindenmayer. 2007. Mind the sustainability gap. *Trends Ecol Evol*. 22:621-624.
- Flickinger, E.L. & J.D. Nichols. 1990. Small mammal populations at hazardous waste disposal sites near Houston, Texas, USA. *Environ Pollut* 65: 169-180.
- Foley, J.A.; DeFries, R.; Asner, G.P.; Barford, C.; Bonan, G.; Carpenter, S.R.; Stuart Chapin, F.; Coe, M.T.; Daily, G.C.; & H.K. Gibbs. 2005. Global consequences of land use. *Science*. 309: 570-574.
- Fuschini Mejía, MC. 1994. El agua en las llanuras. Unesco/Orcyt. Montevideo, Uruguay.
- Galindo, G; Herrero, M.A.; Korol, S. & A. Fernández Cirelli. 2004. Water resources in the Salado river drainage basin of Buenos Aires, Argentina. Chemical and microbiological characteristics. *Int. J. Water Res*. 29(1):81-91.
- García, B.; Rubio F. & M. Carrasco. 1997. Hematología 1. Citología, fisiología y Patología de hematíes y leucocitos. Paraninfo, Madrid, España.
- Gardiner, D.M. and D.M. Hoppe. 1999. Environmentally induced limb malformations in Mink Frogs (*Rana septentrionalis*). *Journal of Experimental Zoology* 284:207–216.
- Gatica, E.A.; Almeida, C.A.; Mallea, M.A.; Corigliano, C.M. & P. González. 2012. Water quality assessment, by statistical analysis, on rural and urban areas of Chocancharava River (Río Cuarto), Córdoba, Argentina. *Environ. Monit. Assess*. 184 (12): 7257–7274.
- Geiger, F.; Bengtsson, J.; Berendse, F.; Weisser, W.W.; Emmerson, M.; Morales, M.B.; Ceryngier, P.; Liira, J.; Tschardtke, T. & C. Winqvist. 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic Appl Ecol*. 11:97-105.
- Ghersa, C.M.; Ferraro, D.O.; Omacini, M.; Martínez-Ghersa, M.A.; Perelman, S.; Satorre, E.H. & A. Soriano. 2002. Farm and landscape level variables as indicators of sustainable land-use in the Argentine Inland-Pampa. *Agric. Ecosyst. Environ*. 93: 279–293.
- Giuliano Albo, M.J. & M.T. Blarasin. 2013. Hidrogeoquímica y estimación del fondo natural de nitratos del agua subterránea en un agroecosistema del pedemonte de la sierra de Comechingones. Córdoba (Argentina). *Revista de la Asociación Geológica Argentina*. 71(3).
- Godfray, H.C.J.; Beddington, J.R.; Crute, I.R.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J.F. & J. Pretty. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*. 327:812-818.

- Goh, E.H. y A.W. Neff. 2003. Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. *Food Chem. Toxicol.* 41(11): 1501-1508.
- Gomez, D.; Sommaro, L.; Steinmann, A.R.; Chiappero, M. & J.W. Priotto. 2011. Movement distances of two species of sympatric rodents in linear habitats of Central Argentine agro-ecosystems. *Mamm. Biol.* 76, 58–63.
- Gómez, M.D.; Coda, J.A.; Serafini, V.N.; Steinmann, A.R. and J. Priotto. 2017. Small mammals in agroecosystems: responses to land use intensity and farming management. *Mastozoología Neotropical*, 24,289-300.
- Gómez, M.D.; Goijman, A.P.; Coda, J.A.; Serafini, V.N.; & J. Priotto. 2018. Small mammal responses to farming practices in central Argentina agroecosystems: The use of hierarchical occupancy models. *Austral Ecology*, doi:10.1111/aec.12625.
- Gonçalves, D.S., Crivellari, L.B. & C.E. Conte. 2015. Linking environmental drivers with amphibian species diversity in ponds from subtropical grasslands. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 87 (3): 1751–1762.
- Gonthier, D. J., Ennis, K. K., Farinas, S., Hsieh, H. Y., Iverson, A. L., Batáry, P., ... & Perfecto, I. 2014. Biodiversity conservation in agriculture requires a multi-scale approach. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1791), 1358.
- Gonthier, D.J.; Ennis, K.K.; Hsun-YiHsieh, S.F.; Iverson, A.L. & P. Batáry. 2014. Biodiversity conservation in agriculture requires a multi-scale approach. *R. Soc. B* 281: 20141358. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1358>.
- Gosner K. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. 16: 183-190.
- Grau, H.R.; Gasparri, N.I. & T.M. Aide. 2005. Agriculture expansion and deforestation in seasonally dry forests of northwest Argentina. *Environ Conserv.* 32:140-148.
- Gray, M.J. & L.M. Smith. 2005. Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians. *J. Wildl. Manag.* 69: 515–524.
- Green, R.E.; Cornell, S.J.; Scharlemann, J.P.W. & A. Balmford. 2005. Farming and the fate of wild nature. *Science*. 307:550-555.
- Guilherme, A.; Virbasius, J.V.; Puri, V. & M.P. Czech. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology*. 9 (5): 367-377.
- Hadji-azimi, I.; Coosemans, V. & C. Canicatti. 1987. Atlas of adult *Xenopus laevis laevis* Hematology. *Developmental and comparative immunology*. Vol. 11, pp 807–874.
- Haratym-Maj, A. 2002. Hematological alternations after pyrethroids poisoning in mice. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 9(2), 199-206.
- Harmon, B.G. 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science*. 77: 972–977.
- Hattam, C. (Ed.). 2003. *Agricultura orgánica, ambiente y seguridad alimentaria* (Vol. 4). Food & Agriculture Org.
- Hegde, G. & S.V. Krishnamurthy. 2014. Analysis of health status of the frog *Fejervarya limnocharis* (Anura: ranidae) living in rice paddy fields of Western Ghats, using body condition factor and AChE content. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 9 (1): 69–76.
- Helbing, C.C., Ovaska, K, Ji, L. 2006. Evaluation of the effect of acetochlor on thyroid hormone receptor gene expression in the brain and behavior of *Rana catesbeiana* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 80: 42-51.

- Herkovits J.; Perez-coll C. & F. Herkovits. 1996. Ecotoxicity in the Reconquista River, Province of Buenos Aires, Argentina: A Preliminary Study. *Environmental Health Perspectives*. 104: 186-189.
- Herkovits, J. & C. Perez-Coll. 1999. Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibio ANFITOX basado en *Bufo arenarum*. Test agudo (ANFIAGU), Crónico corto (ANFICOR), Crónico (ANFICRO) y de Estadios tempranos del Desarrollo (ANFIEMB). *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. 42: 24-30 y 43: 50-55.
- Herrera, L.P.; Panigatti, J.L.; Barral, M.P. & D.E. Blanco. 2013. Biofuels in Argentina. Impacts of Soybean Production on Wetlands and Water. Buenos Aires. Fundación para la Conservación y el Uso Sustentable de los Humedales, Wetlands International. 104 pp.
- Herrero, M.A. & S.B. Gil. 2008. Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. *Ecol. Austral* 18: 273–289.
- Heyer, W.R.; Donnelly, M.A.; Mcdiarmid, R.W.; Hayek, L.C. & M.S. Foster. 1994. *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. (eds.). Washington, Smithsonian Institution Press. 364pp.
- Hibiya, T. 1982. *An Atlas of Fish Histology—Normal and Pathological Features*. Kodansha, Tokyo.
- Hoffman, D.J.; Rattner, B.A.; Burton, G.A. & J. Cairns. 2003. *Hand book of Ecotoxicology*, 2nd ed. FL: Lewis Publishers, Boca Raton. 1290p.
- Hole, D.G.; Perkins, A. J.; Wilson, J. D.; Alexander, I. H.; Grice, P. V. & A.D. Evans. 2005. Does organic farming benefit biodiversity? *Biol. Conserv.* 122: 113-130.
- Holzschuh, A.; Steffan-Dewenter, I.; Kleijn, D. & T. Tschardtke. 2007. Diversity of flower-visiting bees in cereal fields: Effects of farming system, landscape composition and regional context. *Journal of Applied Ecology*. 44: 41–49.
- IFOAM. 2012. International Federation of organic agriculture movements the IFOAM norms for organic production and processing. Published in Germany by IFOAM. Die Deutsche Bibliothek – CIP Cataloguing-in-Publication-Data.
- Jakob, E.M.; Marshall, S.D. & G.W. Uetz. 1996. Estimating fitness: a comparison of body condition indices. *Oikos*. 77: 61-67.
- Johansson, M.; Primmer, C.R.; Sahlsten, J. & J. Merilä. 2005. The influence of landscape structure on occurrence, abundance and genetic diversity of the common frog, *Rana temporaria*. *Global Change Biol.* 11:1664-1679.
- Johnson, P.T.J., D.R. Sutherland, J.M. Kinsella, and K.B. Lunde. 2004. Review of the trematode genus *Ribeiroia* (Psilostomidae): Ecology, life history and pathogenesis with special emphasis on the amphibian malformation problem. *Advances in Parasitology* 57:191–253.
- Johnson, P. T., & Bowerman, J. 2010. Do predators cause frog deformities? The need for an eco- epidemiological approach. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314(7), 515-518.
- Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Ritchie, E.G. & Launer, A.E. 1999. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science* 284, 802–804.
- Johnson, P.T.J.; Lunde, K.B.; Ritchie, E.G.; Reaser, J.K. & A.E. Launer. 2001. Morphological abnormality patterns in a California amphibian community. *Herpetologica*. 57: 336-352.
- Joly, P.; Miaud. C.; Lehmann, A. & O. Grolet. 2001. Habitat matrix effects on pond occupancy in newts. *Cons. Biol.* 15:239-248.

- Kiesecker, J.M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99:9900–9904.
- Kiesecker, J.M.; Blaustein, A.R. & L.K. Belden. 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410: 681-684.
- Kleijn, D.; Kohler, F.; Baldi, A.; Batary, P.; Concepcion, E.D.; Clough, Y.; Diaz, M.; Gabriel, D.; Holzschuh, A. & E. Knop. 2009. On the relationship between farmland biodiversity and land-use intensity in Europe. *Proc R Soc B*. 276:903-909.
- Klucinski, P.; Hrycek, A.; Stasiura-Zielinska, H.; Kossmann, S.; Tustanowski, J.; Friedek, D. & Kaminska-Kolodziej, B. 1996. Humoral and cellular immunity rates in chemical plant workers employed in the production of liquid pesticides. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*. 9: 103-110.
- Knutson, M.G., Richardson, W.B., Reineke, D.M., Gray, B.R., Parmelee, J.R., & Weick, S.E. 2004. Agricultural ponds support amphibian populations. *Ecological Applications*, 14(3), 669-684.
- Knutson, M.G.; Sauer, J.R.; Olsen, D.A.; Mossman, M.J.; Hemesath, L.M. & M.L. Lannoo. 1999. Effects of landscape composition and wetland fragmentation on frog and toad abundance and species richness in Iowa and Wisconsin, USA. *Cons. Biol*. 13:1437-1446.
- Krebs, J.R.; Wilson, J.D.; Bradbury, R.B. & G.M. Siriwardena. 1999. The second silent spring? *Nature* 400:611-612.
- Lajmanovich R.; Izaguirre M. & V. Casco. 1998. Paraquat tolerance and Alteration of internal gills structures of *Scinax nasica* tadpoles (Anura: Hylidae), en: *Arch. Environ. Contam Toxicol*. 34: 364-369.
- Lajmanovich, R.; Sánchez-Hernández, J.C.; Stringhini, G. & P. Peltzer. 2004. Levels of Serum Cholinesterase Activity in the Rococo Toad (*Bufo paracnemis*) in Agrosystems of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 72: 586-591.
- Lannoo M. 2008. Malformed frogs. The Regents of the University of California. 270p.
- Lascano, C.; Sotomayor, V.; Ferrari, A. & A. Venturino. 2009. Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta Toxicol. Argent*. 17: 8-19.
- Lavie, E; Bermejillo, A.; Morábito, J.; Filippini, M. & S. Salatin. 2010. Contaminación por fosfatos en el oasis bajo riego del río Mendoza. *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo 42. N° 1: 169-184.
- Lenhardt, P.P.; Brüh, C.A. & G. Berger. 2015. Temporal coincidence of amphibian migration and pesticide applications on arable fields in spring Patrick. *Basic and Applied Ecology*. 16: 54-63.
- Linder, G., Lehman, C.M., Bidwell, J.R. 2010. Ecotoxicology of amphibians and reptiles in a nutshell. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA (eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, 2nd edn. SETAC Press, California, USA pp 69-103.
- Linder, G.L.; Krest, S.K. & D.W. Sparling. 2003. *Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA.
- Lioi, M.; Scarfi, M.; Santoro, A.; Barbieri, R.; Zeni, O.; Salvemini, F.; Di Bernardino, D. & M. Ursini. 1998. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to Glyphosate, Vinclozolin, Atrazine, and DPX-E9636. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 32:39-46.

- Lüddecke, H. 2002. Variation and trade-off in reproductive output of the Andean frog *Hyla labialis*. *Oecologia*. 130: 403-410.
- Luti, R., Bertran de Solís, M.A.; Galera, F.M.; Müller de Ferreyra, N.; Berzal, N.M.; Nores, M.; Herrera, M.A. & J.C. Barrera. 1979. Vegetación. Pp. 297–367 .In: Vázquez J., R. Miatello, M. Roqué. (eds.). Geografía física de la provincia de Córdoba. Editorial Boldt, Buenos Aires. República Argentina.
- Macdonald, D.W.; Tattersall, F.H.; Service, K.M.; Firbank, L.G. & R.E. Feber. 2007. Mammals agri-environment schemes and set-aside-what are the putative benefits? *Mammal Review*. 37: 259–277.
- Macleod, C. & P. Haygarth. 2003. A review of the significance of non-point source agricultural phosphorus to surface water. *Scope Newsl.* 51: 1–10.
- MAGyA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentos, Provincia de Córdoba). 2013. Resultados campaña agrícola 2012–2013. Dirección general de coordinación de agencias zonales. Unidad Ministerial de Sistema Integrado de Información Agropecuaria. <http://magya.cba.gov.ar/upload/UMSIIA Res 12 13.pdf>.
- Manoel Filho, J. & F. Feitosa. 2000. Hidrogeología: conceitos e aplicações. CPRM. Fortaleza. CE.
- Manzanilla, J. & J. Péfaur. 2000. Consideraciones sobre métodos y técnicas de campo para el estudio de anfibios y reptiles. *Rev. Ecol. Lat. Am.* 7: 17- 30.
- Mañas Torres, F.; Gonzáles Cid Urroz, M. B.; Ovando, H.G.; Anchordoqui, I. W.; Ugnia Vera, L. Larripa Hand, I.B. & N. Gorla Abrate. 2006. La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *Theoria*, Vol. 15 (2): 53-60.
- Marco, A. & A.R. Blaustein. 1999. The effects of nitrite on behavior and metamorphosis in Cascades frogs (*Rana cascadae*). *Environ Toxicol. Chem.* 18: 946–949.
- Marques, S. M.; Antunes, S. C.; Pissarra, H.; Pereira, M. L.; Gonçalves, F. & R. Pereira. 2009. Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi Seoane*) from a uranium mine pond. *Aquatic Toxicology*, 91(2): 187-195.
- Martinez Haro, M.; Beiras, R.; Bellas, J.; Capela, R.; Coelho, J. P.; Lopes, M.; Moreira Santos, A.M.; Reis Henriques, R.; Ribeiro, M.; Santos, M. & J.C. Marques. 2015. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? *Ecological Indicators*, 48, 8-16.
- Martínez, L. 2006. El caso del desempeño locomotor en renacuajos de *Hyla labialis* (Anura: Hylidae). (Tesis no publicada). Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., Swift, M.J. 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* 277:504-509.
- McCoy, K.A., Harris, R.N. 2003. Integrating developmental stability analysis and current amphibian monitoring techniques: an experimental evaluation with the salamander *Ambystoma maculatum*. *Herpetologica* 59(1): 22-36.
- Menzie, C., Bettinger, N., Fritz, A., Kapustka, L., Regan, H., Moller, V., Noel, H. 2008. Population protection goals. En: Barnthouse LW, Munns W R Sorensen MT (eds.) Population-Level Ecological Risk Assessment. CRC Taylor & Francis, Florida, USA pp 41-68.

- Meyer, A.H.; Schmidt, B.R. & K. Grossenbacher. 1998. Analysis of three amphibian populations with quarter-century long time-series. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci. 265:523-528.
- Munné, A.; Prat, N.; Sola, C.; Bonada, N. & M. Rieradevall. 2003. A simple field method for assessing the ecological quality of riparian habitat in rivers and streams: QBR index. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems. 13(2): 147-163.
- Navarrete, D.M.; Gallopin, G.C.; Blanco, M.; Díaz-Zorita, M.; Ferraro, D.O.; Herzer, H.; Lathera, P.; Murmis, M.; Podesta, G.P.; Rabinovich, J.; Satorre, E.H.; Torres, F. & E.F. Viglizzo. 2007. Multi-causal and integrated assessment of sustainability: the case of agriculturization in the Argentine Pampas. Environ. Dev. Sustain. 11: 612–638.
- Newton I. 2004. The recent declines of farmland bird populations in Britain: an appraisal of causal factors and conservation actions. Ibis 146:579-600.
- Nicolli, H., T.; O'Connor, J.; Suriano, M.; Koukharsky, M.; Gómez Peral, L.; Bertini, I.; Cohen, L.; Corradi, O.; Baleani & E. Abril. 1985. Geoquímica del As y de otros oligoelementos en aguas subterráneas de la llanura Sudoriental de Cba. Ac. Nac. de Cs. Cba.
- Nöller, H.G. 1959. Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. Pflüger's Archives of Physiology. 269: 98–100.
- Nori, J.; Lescano, J.N.; Illoldi-Rangel, P.; Frutos, N.; Cabrera, M.R. & G.C. Leynaud. 2013. The conflict between agricultural expansion and priority conservation areas: making the right decisions before it is too late. Biol. Conserv. 159:507–513.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Guías para la Calidad del Agua Potable. Vol 1: Recomendaciones. 3th ed. [en línea] 2006. Versión electrónica para la Web [Consulta 4 de agosto de 2014]. Disponible en http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/es/.
- Palma Acuña, P.S. 2005. Ensayo de micronúcleo en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para la evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el río Traiguen. Tesis presentada para optar al grado de Licenciado en Recursos Naturales. Universidad Católica de Temuco, Facultad de Ciencias, Chile 130p.
- Pechmann, J.H.K.; Scott, D.E.; Semlitsch, R.D.; Caldwell, J.P.; Vitt, L.J. & J.W. Gibbons. 1991. Declining amphibian populations - the problem of separating human impacts from natural fluctuations. Science. 253:892-895.
- Pedlar, R.M., Ptashynski, M.D., Evans, R., & Klaverkamp, J.F. 2002. Toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Aquatic Toxicology, 57(3), 167-189.
- Peltzer, P.; Lajmanovich, R.; Sanchez, L.; Attademo, A.; Junges, C.; Bionda, C.; Martino A. & A. Basso. 2011. Morphological abnormalities in amphibian populations from the mideastern region of Argentina. Herpetological Conservation and Biology. 6: 432–442.
- Peltzer, P.M.; Lajmanovich, C.R.; Attademo, A.M. & W. Cejas. 2005. Diversidad y conservación de anuros en ecosistemas agrícolas de Argentina: implicancias en el control biológico de plagas. INSUGEO, Miscelánea, 14: 399 – 416.
- Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Cabagna-Zenklusen, M.C., Repetti, M.R., Sigrist, M.E. & H. Beldoménico. 2013. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined tree frog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. Ecotoxicology and environmental safety. 98: 142-151.
- Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Teglia, C.M.; Martinuzzi, C.; Curi, L.; Culzoni, M.J. & H.C. Goicoechea. 2017. Ecotoxicity of

- veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 51: 114–123.
- Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Sánchez Hernández, J.C.; Cabagna, M.; Attademo, A.M. & A. Bassó. 2008. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 70: 185-197.
- Pengue, W.A. 2004. Transgenic crops in Argentina and its hidden costs. In: Proceedings of IV Biennial International Workshop “Advances in Energy Studies”. Ortega E. & S. Ulgiati (eds). Unicamp, Campinas, SP, Brazil, pp 91-101
- Perdomo, C.H.; Casanova, O.N. & V.S. Ciganda. 2001. Contaminación de aguas subterráneas con nitratos y coliformes en el litoral sudoeste del Uruguay. *Agrociencia* 5, 10–22.
- Peri, S.I.; Fink, & A. Salibián. 1998. Hematological Parameters in *Bufo arenarum* Injected With Sublethal Dose of Lead Acetate. *Biom. Environ. Scien.* 11: 70-74.
- Peskova, T. 2001. Influence of anthropogenically polluted environment on amphibians. Volgograd. 156 p.
- Peters, R.H. 1983. The Ecological Implication of Body Size. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- Pfeiffer, C.J.; Pyle, H. & M. Asashima. 1990. Blood cell morphology and counts in the Japanese newt (*Cynops pyrrhogaster*). *J Zoo Wildl Med.* 21:56–64.
- Phia, H. Impacts of Agriculture on Amphibians at Multiple Scales. University of Helsinki. Academic dissertation.
- Pineda, E., & Halffter, G. 2004. Species diversity and habitat fragmentation: frogs in a tropical montane landscape in Mexico. *Biological conservation*, 117(5), 499-508.
- Poggio, S.L.; Chaneton, E.J. & C.M. Ghersa. 2010. Landscape complexity differentially affects alpha, beta, and gamma diversities of plants occurring in fencerows and crop fields. *Biol. Conserv.* 143, 2477–2486.
- Pollo, F.E., Grenat, P.R., Salinas, Z.A., Otero, M.A., Salas, N.E., Martino, A.L. 2017. Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine. *Environ Sci Pollut R* 24(22):18179-18187.
- Pollo, F.; Salas, N.; Mancini M. & A. Martino. 2012. Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas. *Acta Toxicol. Argent.* 20: 64-70.
- Pollo, F.E. 2017. Estudios ecotoxicológicos in situ en redes hídricas asociadas a la actividad minera en la provincia de Córdoba, Argentina. Tesis doctoral en ciencias biológicas. 131p.
- Polo Cavia, N., Engstrom, T., López, P., y J. Martín. 2010. Body condition does not predict immunocompetence of western pond turtles in altered versus natural habitats. *Animal Conservation*, 13(3), 256-264.
- Pounds, J.A.; Bustamante, M.R.; Coloma, L.A.; Consuegra, J.A.; Fogden, M.P.; Foster, P.N. & S.R. Ron. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature.* 439 (7073): 161.
- Prieto García, F.; Baez Ramirez, O.A.; Scout, W.; Gaytán Oyarzún, J.C. & A. Zúñiga Estrada. 2007. Toxicidad y teratogénesis por arsénico en el pez cebra [*Danio rerio*]. *Revista de Toxicología.* 24(1): 18-22.

- Quesada Garcia, A.; Valdehita, A.; Torrent, F.; Villarroel, M.; Hernando, M.D. & J.M. Navas. 2013. Use of fish farms to assess river contamination: Combining biomarker responses, active biomonitoring, and chemical analysis. *Aquatic Toxicology*, 140: 439-448.
- Quirós, R. & E. Drago. 1999. The environmental state of Argentinean lakes: an overview. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*. 4 (1-2): 55-64.
- Quirós, R.; Rennella, A.M.; Boveri, M.B.; Rosso, J.J. & A. Sosnovsky. 2002. Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología*. 12: 175-185.
- Rand, T.A.; Tylianakis, J.M. & T. Tschardtke. 2006. Spillover edge effects: the dispersal of agriculturally subsidized insect natural enemies into adjacent natural habitats. *Ecol Lett*. 9:603-614.
- Read, J.L. 1997. Comparative abnormality rates of the trilling frog at Olympic Dam mine. *Herpetofauna* 27: 23-27.
- Reading, C.J. & R.T. Clarke. 1995. The effects of density, rainfall and environmental temperature on body condition and fecundity in the common toad, *Bufo bufo*. *Oecologia*. 102(4): 453-459.
- Relyea, R.A.; Schoepner, N.M. & J.T. Hoverman. 2005. Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecol. Appl*. 15:1125-1134.
- Ringuelet, R.A. 1962. *Ecología acuática continental*.
- Ringuelet, R.A.; Salibián, A.; Claverie, E. & S. Ilhero. 1967. Limnología química de las lagunas pampásicas (Provincia de Buenos Aires). *Physis*. 27 (74): 201-221.
- Robinson, R.A. & W.J. Sutherland. 2002. Changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *J. Appl. Ecol*. 39:157-176.
- Rodríguez, S.C.; De Asmundis, C.L.; Martínez & C. Gloria. 2017. Variaciones estacionales de las concentraciones de fosfatos y nitratos en distintas fuentes de aguas de pequeños productores hortícolas. *Agrotecnia*. 24: 30-34.
- Rohr, J.R., Crumrine, P.W. 2005. Effects of a herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applied* 15: 1135-1147.
- Roschewitz, I.; Gabriel, D.; Tschardtke, T. & C. Thies. 2005. The effects of landscape complexity on arable weed species diversity in organic and conventional farming. *Journal of Applied Ecology*. 42: 873-882.
- Rosenberg, C.E.; Fink, N. E.; Arrieta, M.A. & A. Salibián. 2003. Effect of lead acetate on the in vitro engulfment and killing capability of toad (*Bufo arenarum*) neutrophils. *Comparative Biochemistry and Physiology Part. C* 136: 225-233.
- Salinas, Z.A. 2012. Biomonitoring en diferentes ambientes de la provincia de Córdoba mediante el empleo de biomarcadores hematológicos en *Bufo arenarum*. Trabajo final. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto
- Salinas, Z.A.; Salas, N.E.; Baraquet, M. & A.L. Martino. 2015. Hematological biomarkers of common toad *Bufo arenarum* in altered ecosystems in the province of Córdoba. *Acta Toxicológica*. 23 (1): 25-35.
- Salinas, Z.A.; Baraquet, M.; Grenat, P.R.; Martino A.L. & N.E. Salas. 2017. Morphology and size of blood cells of *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) as environmental health assessment in disturbed aquatic ecosystem from central Argentina. *Environ Sci Pollut Res* DOI 10.1007/s11356-017-0107-y.
- Sánchez de Fuentes, J., 2000. El fósforo, parámetro crítico de calidad de agua. Técnicas analíticas y de muestreo. XXVII Congreso Interamericano de Engenharia Sanitária e

- Ambiental. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. On line:(<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/caliagua/v-100.pdf>).
- Sarmiento, C.; Cabrera, F.; Baldin, S. & C. Primo. 2010. Apoyo a Agricultores para Eliminar el Uso de Pesticidas. *Ciencia*. Vol. 5 (15): 15-30.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*. 31: 9-15.
- Semlitsch, R.D. 2003. Introduction: general threats to amphibians, pp. 1-7. In: *Amphibian Conservation*. R.D. Semlitsch (ed.) Smithsonian Institution, Washington, DC, USA.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2013. Situación de la Producción Orgánica en la Argentina durante el año 2012. Dirección Nacional de Fiscalización Agroalimentaria Dirección de Calidad Agroalimentaria Coordinación de Productos Ecológicos. <http://www.senasa.gov.ar/seccionres.php?in=239&titulo=Estad%EDsticas>.
- Sessions, S.K. & Ruth, S.B. 1990. Explanation of naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. *J. Exp.Zool.*254, 38–47.
- Sessions, S.K. 2003. What is causing deformed amphibians? pp. 168-186. In: *Amphibian Conservation*. R.D. Semlitsch (ed.) Smithsonian Institution, Washington, DC, USA.
- Simms, C. 1969. Indications of the decline of breeding amphibians at an isolated pond in marginal land, 1954–1967. *British Journal of Herpetology*. 4: 93-96.
- Simone, I.; Cagnacci, F.; Provencal, C. & J.J. Polop. 2010. Environmental determinants of the small mammal assemblage in an agroecosystem of central Argentina: the role of *Calomys musculinus*. *Mamm. Biol.* 75, 496–509.
- Sinsch, U. 1990. Migration and orientation in anuran amphibians. *Ethol. Ecol. Evol.* 2:65-79.
- Skelly, D.K., Bolden, S.R., Freidenburg, L.K., Freidenburg, N.A. & Levey, R. (2007). Ribeiroia infection is not responsible for vermont amphibian deformities. *EcoHealth* 4, 156-163.
- Smedley P.L.; Nicolli, H.B.; Macdonald, D.M.J.; J.O. Barros & A.J. Tullio. 2002. Hydrogeochemistry of arsenic and other inorganic constituents in groundwaters from La Pampa, Argentina. *Applied Geochemistry*. 17: 259–284.
- Smith, G.R. 2007. Lack of effect of nitrate, nitrite, and phosphate on wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. *Applied Herpetology*. 4: 287–291.
- Smith, I.R. 1990. Erythrocytic micronuclei in wild fish from Lakes Superior and Ontario that have pollution-associated neoplasias. *J. Great Lakes Res.* 16: 139–142.
- Smith, M.A. & D.M. Green. 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography*. 28:110-128.
- Solbrig, O.T. 1997. Towards a sustainable pampa agriculture: past performance and prospective analysis. Harvard. DRCLAS Working Papers on Latin America Series. p51.
- Soriano, A. 1991. Río de la Plata Grasslands. Pp. 367–407 in R. T. Coupland (ed.), *Natural Grasslands: Introduction and Western Hemisphere*. Serie Ecosystems of the World 8A. Amsterdam. Elsevier.
- Soriano, A. 1992. Río de la Plata grasslands. Pp. 367-407 In: RT Coupland (ed.). *Ecosystems of the world*. 8A. Natural grasslands. Introduction and western hemisphere. Elsevier. New York, USA.
- Stahl, Jr. R.G. 1997. Can mammalian and non-mammalian sentinel species data be used to evaluate the human health implications of environmental contaminants? *Hum Ecol Risk Assess* 3: 329-335.

- Stoate, C.; Boatman, N.D.; Borralho, R.J.; Rio Carvalho, C.; de Snoo, G.R. & P. Eden. 2001. Ecological impacts of arable intensification in Europe. *J. Environ. Manage.* 63:337-365.
- Stuart, S.N.; Chanson, J.S.; Cox, N.A.; Young, B.E., Rodrigues, A.S., Fischman, D.L. & Waller, R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786.
- Szubartowska, E., Gromysz-Kałowska, K., & Wójcik, K. 1990. Behavior of the formed blood elements in *Rana esculents* L. after repeated contacts of the animal with a therapeutic dose of foschlor. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 45(6), 796-803.
- Taigen, T.L., Pough, F.H. 1985. Metabolic correlates of anuran behavior. *American Zoologist* 25: 987- 997.
- Taylor, B.; Skelly, D.; Demarchis, L.K.; Slade, M.D.; Galusha, D. & P.M. Rabinowitz. 2005. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. *Environ. Health Persp.* 113: 1497-1501.
- Thrall, M.A. 2004. Hematology of amphibians. In M. A. Thrall, D. C. Baker, and E. D. Lassen (eds.), *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL. 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:20260-20264.
- Tilman, D.; Cassman, K.G.; Matson, P.A.; Naylor, R. & S. Polasky. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. 418:671-677.
- Toro-Mújica, P.; García, A.; Gómez-Castro, A.G.; Acero, R.; Perea, J. & V. Rodríguez-Estévez. 2011. Sustentabilidad de agroecosistemas. *Arch. Zootec.* 60 (R): 15-39.
- Trenham, P.C.; Koenig, W.D.; Mossman, M.J.; Stark, S.L. & L. Jagger. 2003. Regional dynamics of wetland-breeding frogs and toads: turnover and synchrony. *Ecol. Appl.* 13:1522-1532.
- Tscharntke, T.; Klein, A. M.; Kruess, A.; Steffan-Dewenter, I. & C. Thies. 2005. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity-ecosystem service management. *Ecology Letters.* 8: 857–874.
- 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.
- Tuomisto, H.L.; Hodge, I.D.; Riordan, P. & D.W. Macdonald. 2012. Does organic farming reduce environmental impacts? e A meta-analysis of European research. *Journal of Environmental Management.* 112: 309-320.
- Udroiu, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79: 201–204.
- Valenzuela, A.E.; Silva, V.M. & A.E. Klempau. 2006. Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture.* 251(2-4): 596-602.
- Varela, M.E. & M.E. Sellares 1937a. Sobre la morfología hemática del *Bufo arenarum* (Hensel). *Rev. Soc. Arg. Biol.* 13: 351-361.
- Vervoorst, F.B. 1967. Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado (Provincia de Buenos Aires). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina.

- Villalba G., 1999. Estudio Geohidrológico con énfasis en la geoquímica del F de la cuenca del río El Talita, Dpto. Río Cuarto. Cba. Tesis de Licenciatura. UNRC.
- Vos, C.C. & H.P. Stumpel. 1995. Comparison of habitat-isolation parameters in relation to fragmented distribution patterns in the tree frog (*Hyla arborea*). Land. Ecol. 11:203-214.
- Welsh, H. & L. Ollivier. 1998. Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's redwoods. Ecological Applications. 8: 1118-1132.
- Williams, W.D. 1987. Salinization of Rivers and streams: an important environmental hazard. Ambio. 16: 181-185.
- Wojtaszek, B.F., Staznik, B., Chartrand, D.T., Stephenson, G.R., Thompson, D.G. 2004. Effects of Vision herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. Environmental Toxicology and Chemistry 23(4): 832-842.
- Yang, F.X., Xu, Y., Wen, S. 2005. Endocrine-disrupting effects of nonylphenol, bisphenol A, and p,p- DDE on *Rana nigromaculata* tadpoles. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 75: 1168-1175.
- Young, B.; Stuart, S.; Chanson, J.; Cox, N. & T. Boucher. 2004. Joyas que están desapareciendo: El estado de los anfibios en el nuevo mundo. Nature Serve, Arlington, Virginia. 54p.
- Zhao, J., & Neher, D.A. 2013. Soil nematode genera that predict specific types of disturbance. Applied Soil Ecology, 64, 135-141.
- Zhelev, Z.M. 2007. Investigation on the Blood Differential Formula in *Rana ridibunda* (Anura, Amphibia) from the Area of the Maritsa – Iztok 1 Steam Power Plant. Acta zool. bulg. 59 (2): 181-190.
- Zhelev, Z.M.; Tsonev, S.V. & D.N. Arnaudova. 2017. Health status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in Southern Bulgaria: body condition factor and fluctuating asymmetry. Acta Zool. Bulg. 169–176.