



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

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**MONITOREO DE CURSOS DE AGUA ASOCIADOS A LA
ACTIVIDAD MINERA EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA,
ARGENTINA: USO DE PARÁMETROS BIO-ECOLÓGICOS COMO
INDICADORES**

Lic. Manuel Alejandro Otero

DIRECTOR: Dr. Adolfo Ludovico Martino

CODIRECTOR: Dra. Nancy Edith Salas

Río Cuarto, Diciembre de 2018

COMISIÓN ASESORA Y JURADO DE TESIS

Dra Paola Mariela PELTZER

Universidad Nacional del Litoral, Facultad
de bioquímica y Ciencias Biológicas. Santa Fe,
Argentina.

Firma:

Aclaración:

Dr. Héctor Hugo VARELA

Universidad Nacional de Río Cuarto,
Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y
Naturales. Córdoba, Argentina.

Firma:

Aclaración:

Dr. Jorge Enrique CONIGLIO

Universidad Nacional de Río Cuarto,
Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y
Naturales. Córdoba, Argentina.

Firma:

Aclaración:

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha: Universidad Nacional de Río Cuarto, 14 de Diciembre de 2018

Calificación (número y letra):

A Caro y mi Hijo
A mis padres y hermano

*“Pobre del que tiene miedo de correr riesgos.
Porque ese quizás no se decepcione nunca,
ni tenga desiluciones,
ni sufra como los que persiguen un sueño”*

El instante mágico - Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la beca otorgada que permitió mi formación.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por brindarme la posibilidad de formarme no solo como profesional, sino también como persona.

A los integrantes de la Comisión Evaluadora y jurado de tesis, Dres Paola Peltzer, Hugo Varela y Jorge Coniglio, por acompañarme y guiarme en la realización de este trabajo.

A mis directores de tesis Adolfo Martino y Nancy Salas, por su constante apoyo y buena predisposición, por en el tiempo ofrecido, aportes y observaciones para el desarrollo de este trabajo.

A mis padres, hermano y abuelos, participes necesarios y fundamentales de este, y de todos los momentos de mi vida, por estar siempre a mi lado, por darme la posibilidad de elegir y apoyarme siempre para llegar a donde quiero. Gracias...

A mi Sobrinas, por su amor incondicional, que con sus sonrisas alegran mis días.

A cada uno de los personajes de la cátedra de Ecología, especialmente a Favio “Pollito” por su incansable colaboración en las campañas, ayudando desinteresadamente siempre que lo necesite y por todos estos momentos compartidos.

A mis compañeros de universidad y amigos de la vida, que siempre estuvieron conmigo, gracias por su amistad y apoyo en todo momento.

A Caro, sin duda mi más importante compañía, a quien amo y admiro profundamente. Por ser partícipe de esta etapa de mi vida, por buscar siempre la manera de darme felicidad. Por ser cómplice y compañera en los buenos momentos y sostén en los no tan buenos.

Por último quiero agradecer a la vida, por darme el mejor regalo que todo hombre puede tener “ser papá” . La noticia es reciente y si bien todavía no te conocemos, te esperamos con ansias.

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: 2012-0932.

4) FONCyT-PICT (2014-2017). Categoría: Temas Abiertos. Tipo B: Investigador joven. Tema: “Efectos de la contaminación acústica sobre el canto de advertencia y el comportamiento reproductivo de los anfibios: sus implicancias prácticas en manejo y conservación”. Responsable: Dr. Pablo R. Grenat. Código: 2014-2533.

ÍNDICE

	Página
Índice de Tablas	VII
Índice de Figuras	XIX
Resumen	XI
Abstract	XIII
1- INTRODUCCIÓN	1
1.1. Medio ambiente y minería	2
1.2. Anfibios como indicadores biológicos	4
1.3. Ensamble de anuros como unidad de estudio	5
1.4. Crecimiento y desarrollo larval en ambientes alterados	7
1.5. Demografía y crecimiento poblacional de anuros en ambientes alterados	8
1.6. Justificación del estudio	10
2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
2.1. Hipótesis	14
2.1.1. Predicciones	14
2.2. Objetivos	15
2.2.1. Objetivos Específicos	15
3- MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Área de estudio	18
3.1.1. Caracterización de la zona de estudio	19
3.1.2. Método de explotación de la mina y proceso de tratamiento del mineral	21
3.2. Sitios de muestreo	23
3.3. Caracterización de los sitios de estudio	27
3.3.1. Calidad de agua	27
3.4. Ensamble de anfibios	28
3.5. Crecimiento y desarrollo larval	29
3.5.1. Crecimiento y Desarrollo larval (Experiencia en microcosmos)	31
3.5.2. Crecimiento y desarrollo larval IN SITU	32
3.5.3. Condición corporal y tasas de crecimiento	33
3.6. Esfuerzo reproductivo	34
3.7. Morfometría y demografía de poblaciones adultas	35
3.7.1. Metodología de campo	35
3.7.2. Metodología de laboratorio	37
4- RESULTADOS	41
4.1. Sitios de estudio	42
4.1.1. Caracterización de los sitios de estudio	42
4.1.2. Calidad de agua	44

4.1.2.1. Parámetros Físico-Químicos registrados a campo	44
4.1.2.2. Análisis Físico-Químico del agua en laboratorio	46
4.2. Ensamble de anfibios	49
4.3. Crecimiento y desarrollo larval de <i>Rhinella arenarum</i>	54
4.3.1. Experiencia en microcosmos	54
4.3.1.1. Índices de crecimiento y desarrollo larval	58
4.3.1.2. Metamorfoseados	60
4.3.2. Experiencia en jaulas <i>IN SITU</i>	61
4.3.3. Esfuerzo reproductivo	63
4.4. Morfometría y demografía de poblaciones adultas	64
4.4.1. <i>Rhinella arenarum</i>	64
4.4.1.1. Variables morfométricas en adultos	64
4.4.1.2. Demografía Poblacional en <i>R. arenarum</i>	65
4.4.1.3. Modelos de Crecimiento poblacional de <i>R. arenarum</i>	66
4.4.1.4. Crecimiento óseo de <i>R. arenarum</i>	68
4.4.2. <i>Boana cordobae</i>	70
4.4.2.1. Variables morfométricas en adultos de <i>B. cordobae</i>	70
4.4.2.2. Demografía Poblacional de <i>Boana cordobae</i>	71
4.4.2.3. Análisis demográfico comparativo de <i>B. cordobae</i> entre los diferentes sitios de estudio	73
4.4.2.4. Modelos de Crecimiento poblacional de <i>B. cordobae</i>	75
4.4.2.5. Crecimiento óseo de <i>B. cordobae</i>	76
5- DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	79
5.1. Caracterización de sitios y calidad de agua en la zona de estudio	80
5.1.1. Caracterización de sitios	80
5.1.2. Calidad de agua	82
5.2. Ensamble de anfibios	85
5.3. Crecimiento y desarrollo larval	88
5.4. Morfometría y demografía de poblaciones adultas	91
5.5. Conclusiones y consideraciones finales	95
5.6. Recomendaciones	97
6- BIBLIOGRAFÍA	99

APÉNDICE I: Cuadros comparativos resumen de la morfometría y parámetros de historia de vida de *R. arenarum* y *B. cordobae* para cada sitio de estudio

APÉNDICE II: Copia de publicaciones relacionadas a la tesis

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Variables relevadas para la caracterización y descripción de los sitios de estudio	43
2	Valores medios, desvío estándar, máximo y mínimo de las variables físico-químicas registradas <i>in situ</i> en cada sitio de estudio	44
3	Análisis Químico del agua en laboratorio. Se muestra la media, el desvío estándar y rango de la concentración de iones en las muestras de agua de los diferentes sitios de estudio	48
4	Clasificación Geoquímica del agua según diagrama de Piper	48
5	Especies de anuros capturados en los sitios de muestreo. Taxonomía según Frost, (2018). Se muestra el número de individuos (Porcentaje del total capturado) de cada especie	49
6	Índices de diversidad de los ensambles de anfibios en cada sitio de estudio	50
7	Índices de riqueza y diversidad media (Rango) de los ensambles en cada sitio de estudio luego de realizar rarefacción con Estimates	52
8	Valores medios, Desvio Estándar, Máximo y Mínimo de las variables físico-químicas en cada pecera	54
9	Nº de larvas utilizados y condición en la que llegaron al final de la experiencia	55
10	Tasas de crecimiento y de desarrollo de las larvas al finalizar el experimento	60
11	Variables medidas en los individuos metamorfoseados en los diferentes tratamientos	61
12	Valores medios, Desvio Estándar, Máximo y Mínimo de las variables físico-químicas en cada sitio	61
13	Tasas de crecimiento y de desarrollo promedio de las larvas extraídos de las jaulas de exclusión	63
14	Puestas registradas y características de las mismas en los sitios de estudio	63
15	Valores medios para el largo hocico-cloaca (LHC), Peso y condición corporal (CC) por sexo	64
16	Edad (años) de los individuos adultos discriminados por sitio y sexo	66
17	Parámetros demográficos de las diferentes poblaciones de <i>R arenarum</i> estudiados hasta el momento	66
18	Parámetros de crecimiento en cada sitio de estudio estimado por el modelo de crecimiento de von Bertalanffy. Se muestra el n , la media \pm desvio estandar y los intervalos de confianza (IC 95%) de cada variable. Para todas las estimaciones fueron incluidos recién metamorfoseados, juveniles y adultos	67
19	Área absoluta de hueso (μ^2) de <i>R. arenarum</i> discriminado por sitio y edad	70

20	Valores medios para el largo hocico-cloaca (LHC), Peso y condición corporal (CC) por sexo y sitio de muestreo	71
21	Largo Hocico-Cloaca (LHC in mm), Peso (g) y Edad (años) de <i>B. cordobae</i>	72
22	Parámetros demográficos de <i>B. cordobae</i> . Media \pm desvío (rango) se muestran para cada variable. A= Moda de la edad (frecuencia); MS= Edad de madurez sexual; L= Longevidad; PR= Potencial reproductivo	72
23	Edad (años) promedio \pm Desvío Estandar y Rango (); de los individuos de <i>B. cordobae</i> discriminados por sitio y sexo	74
24	Parámetros demográficos de las diferentes poblaciones de <i>B. cordobae</i>	74
25	Parámetros de crecimiento de <i>B. cordobae</i> en cada sitio de estudio estimado por el modelo de crecimiento de von Bertalanffy. Se muestra el <i>n</i> , la media \pm desvío estandar y los intervalos de confianza (IC 95%) de cada variable. Para todas las estimaciones fueron incluidos recién metamorfoseados, juveniles y adultos	75
26	Área absoluta de hueso (μ^2) de <i>B. cordobae</i> discriminado por sitio y edad	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Geología del batolito Cerro Áspero (BCA) y ubicación de los principales depósitos de fluorita	18
2	Localización de la mina Cerro Negro (CN) y de las principales redes hídricas de la zona de estudio	20
3	Zona de extracción y trituración	21
4	A) Planta de trituración de Fluorita hasta los 12 mm. B) Tanques donde se le agrega soda caustica para elevar pH. C) Celdas de flotación. D) Separación de la Fluorita flotada	22
5	Proceso de secado de la Florita. A) Filtro de vacío, B) Horno de secado de la fluorita, C) Silos de almacenamiento y d) bolsones de fluorita fluotada lista para comercializar	23
6	Piletas de decantación	24
7	Mapa con los sitios de muestreo seleccionados según las características del agua superficial y del nivel de actividad antrópica desarrollada	24
8	Sitios de muestreo incluidos en este estudio	26
9	Pareja de <i>R. arenarum</i> en amplexo y B) Grupo de larvas. Sitio Las Piletas de decantación	30
10	Serie de peceras utilizadas en la experiencia (microcosmos)	30
11	Jaulas de exclusión utilizados para realizar la experiencia a campo	31
12	A) Macho <i>B. cordobae</i> , vista lateral B) Macho de <i>B. cordobae</i> , vista dorsal.	35
13	A) Ejemplar de <i>B. cordobae</i> . B) Ejemplar de <i>R. arenarum</i> . Dedos seleccionados para obtener muestra ósea e identificar el sitio de procedencia	37
14	Diagramas de cajas. Se observan los valores medios (puntos negros dentro de la caja) y desvíos estándar de las principales variables Físico-Químicas en cada sitio de estudio	45
15	Medias mensuales de las variables meteorológicas, obtenidas de la estación instalada en la mina. Precipitaciones (Azul) y Temperatura (Rojo)	46
16	Diagrama de medias. Se observan los valores promedio (punto rojo) y desvíos estándar de la concentración de los principales iones en cada sitio de estudio	47
17	Curvas de rarefacción en las que se relaciona el Índice Chao y el N° de muestreos. CNantes (azul); CNmina (rojo); Piletas (verde); A°V (gris); A°H (naranja)	51
18	Acumulación de especies con respecto al número de individuos muestreados en cada sitio. CNantes (azul); CNmina (rojo); Piletas (verde); A°V (gris); A°H (naranja)	51

19	Análisis de correspondencia canónica. Relación entre variables ambientales (Flechas rojas), especies registradas (triángulos grises) y sitios estudiados (círculos negros)	53
20	Gráficos de barra. Se muestran variables morfométricas medidas en larvas con respecto al transcurso de los días del ensayo. CNantes (rojo), CNmina (azul), Piletas (verde) y A°V (amarillo)	56
21	Regresiones lineales entre el Peso y largo total de larvas del ensayo (microcosmo) para cada sitio de estudio.	57
22	Gráfico de puntos. Se observan el número acumulado de larvas muertas en el transcurso del ensayo (microcosmos) para cada sitio de estudio	58
23	Gráficos de barra. Tasas de crecimiento y desarrollo larval con respecto al transcurso de los días del ensayo. CNantes (rojo), CNmina (azul), Piletas (verde) y A°V (amarillo)	59
24	Gráfico de puntos. Se observan el número acumulado de individuos metamorfoseados en el transcurso del ensayo (microcosmos) para cada sitio de estudio	60
25	Gráfico de barras. Se muestran los valores medios de las variables morofométricas medidas en las muestras extraídas de las jaulas de exclusión con el transcurso de los días. Piletas (Rojo); A°V (Azul)	62
26	Diagramas de cajas. Se observan los valores medios (puntos negros dentro de la caja) y desvíos estándar del peso total y n° de huevos por sitio.	63
27	A) Hembra de <i>R. arenarum</i> A°V (10x). AM: Área Medular. AOT: Área Ósea Total. KL: Kastchenko Line (Linea entre endosteo y periosteo) L: LAGs (Linea de detención de crecimiento).– B) Hembra de <i>R. arenarum</i> CNmina (40x). CM: Cavidad Medular. Flechas indican las 3 LAGs que se observan en el corte	65
28	Curvas de crecimiento poblacional de <i>B. cordobae</i> estimadas por el modelo de von Bertalanffy para cada sexo y sitios de muestreo. CNantes=Naranja; Piletas=Azul; A°V=Verde; A°H=Rojo	68
29	Diagrama de caja con la Comparación del área ósea media de <i>R. arenarum</i> en los diferentes sitios de estudio	69
30	A) Macho de <i>B. cordobae</i> A°V (10x). CF: Corte completo de la Falange. CH: Corte transversal del Hueso. CM: Cavidad Medular – B) Macho de <i>B. cordobae</i> A°V (100x). Flechas indican las 3 LAGs que se observan en el corte	71
31	Curvas de crecimiento estimadas por el modelo de von Bertalanffy para <i>B. cordobae</i> . Hembras (curva punteada) y machos (curva solida)	73
32	Curvas de crecimiento poblacional de <i>B. cordobae</i> estimadas por el modelo de von Bertalanffy para cada sexo y sitios de muestreo. CNantes=Naranja; Piletas=Azul; A°V=Verde; A°H=Rojo	76
33	Diagrama de caja con la comparación de variables óseas de <i>B. cordobae</i> en los diferentes sitios de estudio	77

Resumen

En la provincia de Córdoba hacia fines del siglo XIX, comenzaron importantes explotaciones de minerales industriales, manteniéndose vigente de forma reducida hasta el presente. En la zona del Batolito Cerro Áspero (BCA), naturalmente rica en flúor, se encuentra una empresa privada que se dedica a la extracción a cielo abierto de fluorita. El Flúor promueve el crecimiento y desarrollo de los seres humanos y animales; pero a altas concentraciones, muchos trabajos informan la toxicidad y los efectos en diversos grupos de organismos. Sin embargo la mayoría de estos fueron llevados a cabo en laboratorio y no siempre generan información ecológicamente relevante. Este trabajo permitió evaluar y monitorear in situ, cursos de agua naturales y asociados a la extracción minera de fluorita, utilizando como indicadores parámetros bio-ecológicos de las poblaciones de anuros que habitan en estos ambientes. Se muestrearon 5 sitios: CNantes; sitio aguas arriba de la explotación minera, el mismo nace y discurre sobre roca granítica y posee altas concentraciones de flúor natural. CNmina; circula sobre roca granítica y se utilizó para monitorear las características naturales del curso sumado a los cambios producidos por la actividad minera. Piletas; presas artificiales que reciben el agua residual del proceso de flotación de la fluorita. A°V; sitio sobre el arroyo Vallecitos que discurre sobre roca metamórfica, sin flúor natural, pero se une aguas abajo con el arroyo CN. A°H; sitio alejado del campamento minero, circula sobre roca metamórfica sin relación alguna con la actividad minera. Se realizó la caracterización de los sitios mediante parámetros Físico-Químicos del agua, se midieron variables de sitio y paisaje. Se caracterizó los ensambles de anuros en cada sitio (mediante riqueza, equitatividad y diversidad de especies). Para evaluar el potencial efecto de cada sitio sobre el crecimiento y desarrollo larval en la etapa acuática, se realizaron experiencias in situ (jaulas de exclusión) y en laboratorio (microcosmos). Con respecto a los individuos en la etapa terrestre, se determinaron características demográficas, de crecimiento y de estructura de las poblacionales; para ello se capturaron los individuos visualizados en cada sitio, se les registró el sexo, estadio, largo total, peso y se realizó el corte de una falange para determinar edad mediante esqueletocronología. Los resultados de este estudio indican que las Piletas de decantación presentan grandes concentraciones de Iones, muy por encima de los valores permitidos para la conservación de la biota y para el consumo humano. Mediante el análisis de una multiplicidad de parámetros de sitio y paisaje determinamos diferente grado de perturbación en los sitios (Piletas>CNmina>CNantes>A°V≥A°H). El sitio A°V tiene la mayor diversidad de especies, seguido de las Piletas, que más allá de ser un sitio artificial altamente perturbado, soporta poblaciones adultas relativamente abundantes. Mientras que los arroyos naturales asociados a la mina (CNantes y CNmina) presentan baja riqueza y abundancia de especies. En la experiencia de microcosmos y en la experiencia *In situ*, la tendencia del crecimiento y desarrollo larval fue similar. En las piletas, la mortalidad fue alta, el reclutamiento bajo y bajas tasas de desarrollo. Mientras que en el resto de los sitios no se observaron mayores diferencias en los parámetros biológicos considerados. La alteración del hábitat, provocó reajustes en las características de historia de vida en las poblaciones de *R. arenarum* y *B. cordobae*, destacándose un retardo en alcanzar la madurez y una longevidad reducida en las poblaciones provenientes de las piletas de

decantación. Las diferencias obtenidas en los rasgos de la historia de vida entre los sitios estudiados, pueden explicarse por la disminuida longevidad de los individuos y/o por el crecimiento compensatorio que observamos en la Piletas y en menor medida en CNantes y CNmina. Con el análisis de la multiplicidad de parámetros bio-ecológicos expuestos se determinó que la afectación del emplazamiento minero Cerro Negro, es puntual y limitado casi exclusivamente a la Piletas de decantación. Por otro lado, Los arroyos estudiados, si bien poseen diferente grado de perturbación, no representan en la actualidad un peligro considerable para la biota relacionada.

Abstract

In Córdoba province towards the end of the 19th century, began significant holdings of industrial minerals, remaining in reduced effect form to the present. In the Cerro Áspero Batholith, naturally rich in fluorine, there is a private company dedicated to the open-pit fluorite extraction. Fluoride promotes the growth and development of human and animals, but at high concentrations, many papers report the toxicity and the effects of fluoride in different organisms. However, most of these were carried out in the laboratory and do not always generate ecologically relevant information. This work allowed to evaluate and monitoring in situ water courses associated to fluorite mine, using bio-ecological parameters of the anuran populations as indicators. Five sites were sampled: CNantes; upstream of the mining, it is born and runs on granite rock and has high concentrations of natural fluorite. CNmina; circulates on granite rock and was used to monitor the natural characteristics, and the changes produced by mining activity. Piletas; artificial dams that receive the residual water from the fluorite flotation process. A°V; runs on metamorphic rock, without natural fluorine, but joins downstream with the CNmina. A°H; site remote from the mining camp, circulates on metamorphic rock without relation with the mining activity. The characterization of the sites was carried out using water physical-chemical parameters; in addition, site and landscape variables were measured. The anurans assemblages were characterized in each site (through richness and species diversity). To evaluate the potential effect of each site on larval growth and development, in situ (exclusion cages) and laboratory (microcosms) experiments were performed. Respect to individuals in terrestrial stage, demographic, growth and age structure of the population were assessed; to do this, the individuals in each site were recorded for sex, stage, total length, weight and a phalanx was cut to determine age by skeletochronology. The results indicate that Piletas have large concentrations of ions, well above the values allowed for the conservation of biota. Analyzing a multiplicity of site and landscape parameters we determine different degree of disturbance in the sites (Piletas > CNmina > CNantes > A°V ≥ A°H). A°V has the greatest diversity of anuran species. In addition Piletas, which beyond being a highly disturbed artificial site, supports relatively abundant populations. While the natural streams associated with the mine (CNantes and CNmina) show low richness and abundance of anuran species. In microcosm and in situ experiences, the tendency of larval growth and development were similar. In the pools, mortality was high, recruitment was low and rates of development were low. In Piletas, larval mortality was high, recruitment and rates of development were low. While in the rest of streams no significant differences were observed in any biological endpoints. The alteration of an environment related to fluorite mine caused readjustments in anuran life history traits, mainly a delayed sexual maturity and reduced longevity in populations from Piletas. Differences obtained in life history traits may be explained by the lack of survival of larger/older individuals or compensatory growth that we observed in Piletas and to a lesser extent in CNantes and CNmina. With the analysis of the multiplicity of bio-ecological parameters, we determined that the affectation of the Cerro Negro mining site is punctual and limited almost exclusively to Piletas. On the other hand, the streams studied have a different degree of

disturbance, but at the present do not currently represent a considerable danger for the related biota.

1- INTRODUCCIÓN

1.1. Medio ambiente y minería

El agua al mismo tiempo que constituye el líquido más abundante en la tierra, representa el recurso natural más importante y la base de toda forma de vida. Por otra parte, regula la temperatura ambiental del planeta e interviene de alguna manera en la mayoría de las actividades humanas, tanto de explotación como de utilización de los recursos, convirtiéndose en un factor determinante para la organización del territorio (Margalef, 1983). Además, a medida que las poblaciones humanas continúan creciendo, los conflictos regionales sobre el agua, la degradación ecológica, las enfermedades y la mortalidad son cada vez más frecuentes (Gleick, 1998).

Las actividades antropogénicas necesarias para los requerimientos que la sociedad demanda, son las principales causas de la disminución y modificación del hábitat natural, generando alteración, pérdida y destrucción de los ambientes (Stuart *et al.*, 2004; Beebee y Griffiths, 2005; Blaustein *et al.*, 2011). La contaminación de los sistemas acuáticos, tanto en agua superficial como subterránea, es una de las amenazas más perceptibles, y la naturaleza de los contaminantes varía, dependiendo de las actividades que se desarrollen en esas áreas (Gatica *et al.*, 2012). Muchas son las causas de tal degradación que van desde prácticas agrícolas (Bionda *et al.*, 2011; Babini *et al.*, 2015b) a actividades industriales como la minería (Castro *et al.*, 2003; Antunes *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2008; Othmani *et al.*, 2015).

La actividad minera desempeña un papel importante para el hombre contribuyéndole principalmente en el aspecto social y económico. Sin embargo, algunos investigadores (Kapelus, 2002; Yakovleva, 2005) indican que las actividades mineras causan el daño más significativo y a menudo irreversible en el medio ambiente natural en comparación con otros sectores industriales. La actividad minera produce deforestación de extensas áreas, cambio del cauce de los ríos, deterioro de los ecosistemas, contaminación de las fuentes hídricas, contaminación de suelos, generación de residuos peligrosos y numerosos componentes químicos (Welsh y Ollivier, 1998; Milu *et al.*, 2002; Owor *et al.*, 2007), los cuales repercuten directamente sobre los ecosistemas acuáticos, terrestres y aéreos (Welsh y Ollivier, 1998; El Khalil *et al.*, 2008).

Desde finales del siglo XX las compañías mineras internacionales han multiplicado sus inversiones en exploración y explotación en todo el mundo. Por lo cual la industria minera, comenzó a requerir de gran atención por los costes ambientales que pueden ser

generados, reconociendo el daño a poblaciones humanas, la vida silvestre y los ecosistemas relacionados a estos (Beasley y Levensgood, 2007). Debido a esto, en los últimos años, la industria minera mundial ha asumido un criterio de responsabilidad social y ambiental (Cowell *et al.*, 1999). La naturaleza finita de no renovables, los diversos impactos asociados con su extracción y uso, la importancia económica de las industrias de extracción primaria en algunos países y la impactos sociales en las comunidades locales asociadas con las actividades mineras han llevado a que la industria minera aborde el papel de divulgadores de la información social y ambiental (Tilt y Symes, 1999). La Responsabilidad Social Empresarial (RSE) como campo, se ha expandido rápidamente desde la Cumbre de la Tierra en 1992, que ejerció presión sobre las empresas y la industria para que sean socialmente responsables y contribuyan activamente al desarrollo sostenible (Mutti *et al.*, 2012). Sin embargo, los peligros que derivan de la actividad minera, están recibiendo una creciente atención, en los países industrializados, pero no tanto en los países en desarrollo (Owor *et al.*, 2007), como es el caso de Argentina.

En Argentina, durante las décadas del 40 y del 50 se produce una diversificación económica y minería, gracias al estímulo de la actividad minera a través del Fondo de Fomento Minero. Pero no fue hasta principios de los años noventa, en que Argentina se convirtió en un emergente productor de metales en América de Sur. La ley de inversiones mineras promulgadas en 1993, ha sido, sin dudas el factor determinante en la atracción de inversiones. Ya en el año 1995, Argentina fue calificada, por la *International Investment Conference*, como uno de los países más interesantes para realizar inversiones en minería (Prado, 2005). Sin embargo, comparado con otros países de la región, Argentina ha tenido históricamente escasa explotación minera, por lo que no hay clara conciencia de los problemas que puede generar. Además, La legislación Argentina no define, el establecimiento obligatorio de fondos mínimos de garantía por las compañías mineras que aseguren la remediación de los problemas ambientales creados por sus actividades. Por lo tanto, debido a esta falencia en el país, sería de importancia la realización de estudios y monitoreos a largo plazo que contemplen los potenciales efectos de la actividad minera sobre el medio ambiente y los organismos asociados.

1.2. Anfibios como indicadores biológicos

Los organismos que se encuentran asociados a ambientes en donde se realizan actividades antrópicas, pueden estar expuestos a diferentes contaminantes, los cuales pueden ser monitoreados a través de parámetros físico-químicos. Sin embargo, Para la evaluación de la carga toxica que pueden soportar los ambientes acuáticos se está proponiendo el uso de *indicadores biológicos* como herramienta eficaz para el monitoreo de un ambiente. Muchos autores indican que los análisis químicos por si solos son una “fotografía instantánea” por lo tanto los efectos de los contaminantes solo se detectan si esta fotografía fue en el momento exacto. Es decir, los resultados son puntuales en la dimensión cronológica y no revelan mucho de la evolución (disolución) de una carga contaminante y la capacidad resiliente y amortiguadora de los ecosistemas acuáticos (Sanchez Velez y Garcia Nunez, 1999). Por tal motivo, se considera al método biológico como una prueba significativa para evaluar la salud ambiental, jugando un importante rol en la interpretación y manejo de los recursos hídricos debido a ciertas ventajas como su nivel integrativo y bajo costo (Welsh y Ollivier, 1998).

Son diversas las especies de peces, macroinvertebrados y anfibios (Connon *et al.*, 2012; Plötner y Matschke, 2012; Pander y Geist, 2013), que desde hace siglos se han identificado y utilizado para detectar la existencia de sustancias tóxicas, y consecuentemente inferir sobre la calidad y condiciones de un ambiente contaminado. A estas se les ha dado el nombre genérico de bioindicadores. Los estudios con poblaciones de anfibios anuros constituyen una eficaz herramienta en la comprensión de los posibles efectos de los cambios ambientales en las poblaciones naturales, ya que los anfibios resultan buenos indicadores de la salud ambiental (Young *et al.*, 2004).

Entre las principales características que cumplen con este interesante rol de bioindicadores, se encuentran el de poseer un ciclo de vida complejo alternando fases, acuática y terrestre. La exposición directa de los anfibios anuros a productos químicos presentes en el ambiente, ocurre tanto por vía oral como cutánea, a través de su piel permeable, mientras que la bioacumulación en la cadena alimentaría puede ocurrir a través de la dieta de los mismos (Duellman y Trueb, 1994; Beebee, 1996). La sensibilidad de los anfibios en todas sus fases de vida se debe principalmente a su piel permeable en los estadios terrestres y sus huevos poseen una cubierta delgada y poco protectora, permitiendo el intercambio de materiales con el medio; su baja tasa metabólica; su pobre

habilidad para la desintoxicación de biocidas absorbidos y su alta tasa de bioacumulación comparada con otros animales de su misma posición trófica. Además, la alternancia de hábitats acuáticos y terrestres representa un doble riesgo, ya que cualquier tipo de contaminación en alguno de ellos podría afectar la supervivencia de las poblaciones (Cei, 1980; Duellman y Trueb, 1994; di Tada, 1999; Young *et al.*, 2004; Autrom, 2010). Los anfibios tienen una capacidad de dispersión limitada y son altamente filopátricos (Seppä y Laurila, 1999). Estos atributos permiten la acumulación de diferencias genéticas y morfológicas (Blouin y Brown, 2000; Miaud y Merilä, 2001) como así también en parámetros de historias de vida (Berven y Gill, 1983; Laurila *et al.*, 2001; Bernardo y Reagan-Wallin, 2002). Por lo tanto, los anfibios pueden funcionar como centinelas de las condiciones locales (Blaunstein y Johnson, 2003; Mendez *et al.*, 2004). Sin embargo, Keller *et al.*, (2009) sugiere que a la hora de utilizar a los anfibios como bioindicadores resulta importante considerar que las características especie-específicas, dependiendo si son especies de hábitos terrestres, arborícolas o acuáticas, pueden explicar un mayor o menor efecto en la población si una alteración en el ambiente ocurre.

Debido a estas características, muchos estudios han demostrado efectos adversos de las aguas residuales generadas por las actividades mineras en los anfibios. Las principales contribuciones al conocimiento de estos efectos han sido trabajos en laboratorio relacionados con la supervivencia, el crecimiento, el desarrollo de larvas (Tejedo y Fieques, 2003; Muñoz-Escobar y Palacio-Baena, 2010; Lanctot *et al.*, 2016), genotoxicidad y citotoxicidad (Djomo *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2008, 2009, 2013). Además, se realizaron algunos trabajos de campo en los que se evaluaron la diversidad de especies (Ortiz *et al.*, 2003; Aguilar *et al.*, 2012; Mazerolle, 2003; Noguera, 2015) y análisis de genotoxicidad *in situ* (Pollo *et al.*, 2016). Sin embargo, es escasa la información de los efectos de la actividad minera sobre los anfibios en condiciones reales de exposición, provenientes de investigaciones a campo y a largo plazo.

1.3. Ensamble de anuros como unidad de estudio

La comunidad es una agrupación de poblaciones de especies que interactúan y se presentan juntas en el espacio-tiempo (Odum, 1971; Begon *et al.*, 1988). Aquellas comunidades en las que no pueden establecerse ni asegurarse las interacciones entre sus componentes son denominadas ensambles (Newman y Clements, 2008). Tanto las

comunidades como los ensambles son estudiados por la ecología de comunidades. Su principal objetivo se centra en caracterizar la variación en el número y tipo de especies que se hallan en diferentes ubicaciones y entender el rol de los procesos bióticos y abióticos responsables de estas diferencias (Bellwood y Hughes, 2001).

Dada la posibilidad de evaluar las respuestas de numerosas especies simultáneamente, se sugiere que, la ecotoxicología de comunidades puede proporcionar un contexto mucho más amplio para la evaluación de la contaminación ambiental que el estudio de las especies individuales y se basa en dos supuestos: 1) la composición y estructuración de las comunidades reflejan las condiciones locales del ambiente y las respuestas generadas por alteraciones antrópicas y 2) las especies difieren en su sensibilidad a los contaminantes antropogénicos, generando cambios en la estructura y funcionalidad de los sitios contaminados (Newman y Clements, 2008). Para abordar la ecotoxicología de comunidades, existe un gran consenso sobre el hecho de que ciertas medidas de diversidad (Riqueza, abundancia e índices de diversidad dominancia y equitatividad) pueden ser usadas como indicadoras del buen funcionamiento de un sistema (Magurran, 1988). Sin embargo, los índices de diversidad son frecuentemente sugeridos, dado que ofrecen la posibilidad de integrar riqueza y abundancia en un mismo índice (Moreno, 2002; Feisinger, 2003).

Por otro lado, la organización o estructura de las comunidades es el resultado de las interacciones entre las diferentes poblaciones que la componen. La competencia y la depredación son las principales determinantes en su organización (Begon *et al.*, 1988). Sin embargo, otras fuerzas como la especialización, la estocasticidad ambiental, la estructura y características del paisaje, la biogeografía histórica, los niveles de disturbio y el clima son consideradas relevantes en la estructuración de una comunidad (Guerry y Hunter, 2002; Parris, 2004; Ernst y Rödel, 2008; Keller *et al.*, 2009).

Distintos trabajos analizan la influencia de la heterogeneidad espacial y ambiental en la diversidad y riqueza de especies de anfibios (Pearman, 1997; Gray *et al.*, 2004; Peltzer *et al.*, 2003; Peltzer *et al.*, 2006; Schaefer, 2006; Keller *et al.*, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2009). Las perturbaciones en un hábitat reducen el número de nichos y aumentan la variabilidad de las condiciones físicas, lo cual conduce a una reducción de la riqueza, diversidad y equitatividad de especies (Hazell *et al.*, 2001; Peltzer y Lajmanovich, 2001; Peltzer *et al.*, 2003).

Por lo tanto, para realizar un correcto estudio de ecotoxicología de comunidades no solo debe contabilizarse el número y tipo de especie del ensamble sino que además debe considerarse su asociación con variables a nivel de paisaje y a nivel local que describan la heterogeneidad espacial y ambiental.

1.4. Crecimiento y desarrollo larval en ambientes alterados

Dentro del ciclo de vida de los anfibios, la fase acuática, especialmente la embrionaria, resulta la más utilizada para los estudios de toxicidad por reunir las características ideales en cuanto a sensibilidad, elevado número y alta homogeneidad de individuos. También, la facilidad y economía de la obtención del material y del mantenimiento, colaboran para que los estudios utilizando embriones y larvas de anfibios se encuentren dentro de los más frecuentes en toxicología ambiental (Herkovits *et al.*, 1996; Autrom, 2010). En este contexto, resulta valioso el conocimiento sobre la ecología de larvas de anfibios, ya que los estadios larvales presentan un rol fundamental en la regulación de la fase adulta (Heyer, 1974; Wilbur, 1980).

Los renacuajos de anuros son sensibles a las alteraciones en su entorno acuático y son indicadores de niveles nocivos de contaminación (Cooke, 1981). Los impactos en las primeras etapas del desarrollo pueden afectar negativamente el reclutamiento de metamorfos (Schmutzer *et al.*, 2008; Burton *et al.*, 2009), por lo que las poblaciones y la estructura de las comunidades de anfibios se ven afectadas (Gray *et al.*, 2004). Por lo tanto, los estudios que se centran en el efecto de los contaminantes presentes en los cuerpos de agua sobre la salud de las larvas de anfibios proporcionan información crucial para su conservación (Ficken y Byrne, 2012) y constituyen un signo de advertencia del nivel de modificación de un ambiente dado (Lajmanovich *et al.*, 2010; Da Rocha, 2011).

En organismos con ciclos de vida complejos, caracterizados por etapas de vida discretas (Wilbur, 1980), el tiempo y la condición en la cual los individuos alcanzan un punto crítico entre etapas (Eclosión, metamorfosis, etc.) son cruciales en la determinación de la subsecuente sobrevivencia y desarrollo (Rowe y Ludwig, 1991). Existe amplia evidencia de plasticidad en la duración de las diferentes etapas de historias de vida, y de que la variación de factores ambientales como la temperatura, predación, presencia de contaminantes y abundancia de alimentos durante etapas tempranas del desarrollo pueden

influir sobre el crecimiento, fecundidad y sobrevivencia en etapas tardías del desarrollo (Semlitsch *et al.*, 1988; Van Buskirk y Saxer, 2001; Altwegg y Reyer, 2003; Giménez, 2006; Pechenik, 2006; Peltzer *et al.*, 2008, 2013). Los cambios que se presentan en el desarrollo embrionario y larval, pueden ser utilizados para medir el impacto de sustancias contaminantes en los ecosistemas, dando así señales de zonas afectadas por contaminantes, como los desechos de la industria minera (Hernández *et al.*, 2013). Algunas investigaciones han mostrado el efecto de diferentes concentraciones de sustancia provenientes de la industria minera, reportando una reducción de las tasas de crecimiento y desarrollo larval de numerosas especies de anfibios anuros (Sharma y Patiño, 2009; Barry, 2011; Marques *et al.*, 2013; Melvin *et al.*, 2013; Pollo *et al.*, 2016). Además, desde hace un tiempo se han desarrollado ensayos biológicos de ecotoxicidad que representan herramientas de diagnóstico ambiental adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba, *complementarios* a los análisis fisicoquímicos del Agua. Los mismos pueden llevarse a cabo, bajo condiciones experimentales específicas y controladas en laboratorio o a campo (Castillo Morales *et al.*, 2004). Este tipo de ensayos han sido llevados a cabo por diferentes investigadores, utilizando larvas de anfibios como indicador, tanto en limnocorrales a campo (Acosta, 2009), como en microcosmos controlados (Peltzer *et al.*, 2013; Babini *et al.*, 2016).

Por lo tanto resulta importante realizar ensayos biológicos de ecotoxicidad, a campo y laboratorio, para evaluar los potenciales efectos del agua proveniente de arroyos asociados a la actividad minera sobre las respuestas biológicas de larvas de anfibios.

1.5. Demografía y crecimiento poblacional de anuros en ambientes alterados

El particular ciclo de vida acuático-terrestre de los anfibios, coloca a estos organismos en doble peligro, porque una alteración en la calidad o disponibilidad de ambos hábitats puede alterar su ciclo de vida y afectar a las poblaciones (Dunson *et al.*, 1992). En especies con ciclos de vida complejos, alteraciones ambientales que afectan los primeros puntos críticos del desarrollo pueden tener un impacto particularmente importante en la aptitud posterior (Orizaola *et al.*, 2010). Esto es, que el tiempo y las condiciones de desarrollo y metamorfosis, pueden tener fuertes efectos en el crecimiento, supervivencia y reproducción en las etapas terrestres (Semlitsch *et al.*, 1988; Altwegg y Reyer, 2003). Sin embargo, los organismos pueden mitigar los efectos de un retraso al inicio de una etapa de

vida determinada al aumentar el crecimiento y el desarrollo durante las últimas etapas, mostrando lo que se conoce como crecimiento compensatorio o de recuperación (Metcalfe y Monaghan, 2001; Mangel y Munch, 2005). Las tasas de crecimiento suelen ser submáximas, probablemente debido a los costos asociados con un mayor crecimiento, y puede aumentarse después de un período de crecimiento desfavorable (Arendt, 1997; Biro *et al.*, 2006). El crecimiento compensatorio es generalizado, y se reconoce como una estrategia clave para optimizar las trayectorias de crecimiento bajo condiciones ambientales muy variables (Orizaola *et al.*, 2010)

Los ambientes perturbados por el ser humano pueden desencadenar cambios adaptativos rápidos e intrincados en los rasgos de vida y la aptitud física de los organismos (Carroll *et al.*, 2014; Alberti *et al.*, 2017; Rivas-Torres *et al.*, 2017). Los anfibios en su etapa terrestre, pueden adaptarse a hábitats antrópicos (Hua *et al.*, 2015), aunque el deterioro ambiental a menudo aumenta la mortalidad (Collins y Kays, 2011). La teoría de “*historias de vida*” predice una mayor inversión reproductiva como una respuesta adaptativa al aumento de la mortalidad (Partridge y Harvey, 1988; Stearns, 1992). Además, diversos autores han determinado una correlación positiva entre la mayor inversión reproductiva en anuros y el tamaño corporal de los mismos (Davies y Halliday, 1977; Liao *et al.*, 2015).

Por lo tanto, teniendo en cuenta la teoría de “*historias de vida*” y considerando que puede o no producirse un efecto compensatorio por aceleración del crecimiento, en diferentes etapas larvas-adulto (Orizaola *et al.*, 2010); resulta importante el conocimiento del tamaño de los individuos adultos y la demografía e historias de vida de las poblaciones de anfibios que habitan ambientes perturbados. La estructura de edad de una población afecta su crecimiento y provee información sobre la historia reciente, el estado actual y la probabilidad de tendencia futura de la población (Dimmick y Pelton, 1996). Otro parámetro que puede resultar una medida eficaz de la salud de los individuos es el crecimiento individual (aumento de tamaño o peso a medida que aumenta la edad del individuo) (Ogle, 2010). La edad y tamaño de maduración sexual, longevidad, crecimiento individual y otros aspectos que influyen en los ciclos reproductivos, remodelan y describen características de historias de vida de una población. Hasta el presente, poco se sabe sobre el efecto de la actividad minera en la configuración de los rasgos de historias de vida de los anfibios. De este modo, el conocimiento de la dinámica demográfica de poblaciones de anfibios resulta clave para establecer los posibles efectos de una alteración o cambio en su

ambiente, ya que a partir de la misma, se estiman parámetros ecológicos básicos de una población (Sinsch *et al.*, 2001, 2002).

1.6. Justificación del estudio

La Provincia de Córdoba posee una rica historia minera que inicia hacia fines del siglo XIX, cuando comenzaron importantes explotaciones de minerales industriales, manteniéndose vigente de forma reducida hasta el presente. En la zona del Batolito Cerro Áspero (BCA), naturalmente rica en flúor, se encuentra una empresa privada que se dedica a la extracción a cielo abierto de fluorita, el cual posee una reserva de alrededor de 900.000 toneladas, habiéndose extraído hasta la actualidad 350.000 tn (Coniglio, 2006). Estudios sobre la caracterización físico-química del agua superficial realizados en la zona, indican que el ion fluoruro se encuentra en concentraciones menores a 0.35 mg/l para arroyos presentes en ambientes metamórficos, mientras que en arroyos que circulan por un ambiente granítico la concentración media es de 0.90 mg/l (Coniglio, 2006).

El flúor está ampliamente distribuido en la naturaleza en muchas formas excepto en forma libre. Este solo existe en combinación con otros elementos en compuestos fluorados (Camargo, 2003; Mittal y Flora, 2006). A bajas concentraciones el flúor juega un importante rol al promover el crecimiento, el desarrollo y a mantener el sistema esquelético (Camargo, 2003; Zhao *et al.*, 2013). Sin embargo a altas concentraciones el flúor puede causar daños en tejidos, órganos y producir variaciones en procesos fisiológicos. Entre estas alteraciones se encuentran: Fluorosis ósea y dental en humanos (Krishnamachari, 1986); Potencialidad clastogénica del ion fluoruro *in vivo* en algunos organismos como es el caso de *Allium cepa*, *Tetrapygnus niger* y larvas *Caudiverbera caudiverbera* (Hermosilla y Ortega, 1989); Fluorosis ósea en ratas, afectando diferentes tipos de células que participan en el crecimiento y desarrollo óseo, como los osteoblastos y osteoclastos (Yan *et al.*, 2010) y en anfibios anuros está demostrado en laboratorio que el exceso de flúor en los estadios larvales puede impedir el desarrollo esquelético y producir un importante retraso para llegar a la metamorfosis (Hermosilla y Ortega, 1989; Mann *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013), además de limitar el proceso de osificación en el climax metamórfico (Zhao *et al.*, 2013).

Los estudios antes mencionados informan la toxicidad y los efectos del fluoruro en muchos grupos de organismos. Sin embargo la mayoría de estos fueron llevados a cabo en laboratorio y no siempre generan información ecológicamente relevante, ya que las situaciones de campo pueden no ser simuladas con precisión en el laboratorio y la recolección, almacenamiento o manipulación de la muestra puede modificar los resultados (Castro *et al.*, 2003).

La actividad minera de extracción de flúor podría afectar a la integridad ecológica de las redes hídricas asociadas al Batolito de Cerro Áspero. Por lo tanto, un estudio a largo plazo *in situ* que establezca la incidencia real de dicha actividad sobre el desarrollo y crecimiento de las poblaciones y la diversidad de los ensambles de anfibios anuros, resulta necesario para comprender los posibles efectos sobre el ambiente de dicha actividad minera.

2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

H1: La actividad minera altera los ecosistemas naturales condicionando la presencia de especies de anfibios anuros.

H2: Debido a las posibles alteraciones en las redes hídricas asociadas a la minería pueden encontrarse alteraciones en el crecimiento, desarrollo y condición corporal de las larvas de anfibios.

H3: La alteración del hábitat provoca reajustes en las características de historias de vida de los anfibios adultos, que se reflejan en variaciones de edad promedio de los individuos, en la edad en la que alcanzan la reproducción o en las tasas de crecimiento individual.

2.1.1. Predicciones

P1: Los cuerpos de agua asociados directamente a la actividad minera presentarán valores de los parámetros físico-químicos del agua que indicarán alta perturbación antrópica.

P2: Los ensambles de anfibios asociados a ambientes perturbados por la minería se caracterizarán por su bajo número de especies y baja abundancia de individuos con respecto a los ensambles de ambientes no perturbados.

P3: En los sitios asociados directamente a la actividad minera la mortalidad sobre los estadios larvales será mayor, el tiempo de desarrollo y crecimiento a la metamorfosis será mayor y el reclutamiento de metamorfos será menor, que en las poblaciones de los sitios no perturbados por la minería.

P4: Las poblaciones de anfibios en ambientes perturbados tendrán una menor edad promedio, un retardo en alcanzar la edad reproductiva y un crecimiento individual reducido con respecto a las poblaciones provenientes de ambientes no perturbados por la actividad minera.

2.2. OBJETIVOS

Evaluar y monitorear cursos de agua naturales y asociados a la extracción minera de fluorita, en el Batolito Cerro Áspero, provincia de Córdoba, utilizando como indicadores parámetros bio-ecológicos de las poblaciones de anfibios anuros que habitan en estos ambientes.

2.2.1. Objetivos Específicos

OE1: Caracterizar los sitios de estudio y monitorear a través del tiempo la calidad del agua mediante parámetros físico-químicos.

OE2: Determinar la riqueza y diversidad específica del ensamble de anfibios anuros en cada sitio de estudio.

OE3: Explorar los posibles efectos de la actividad minera sobre el desarrollo, crecimiento y condición corporal de larvas de anfibios anuros en los diferentes sitios de estudio.

OE4: Analizar y monitorear la demografía poblacional de los anfibios anuros presentes en cada sitio mediante la determinación de la edad específica por esqueletocronología y el posterior análisis de los parámetros de historias de vida (estructura de edad, longevidad, tasa de crecimiento individual, edad promedio y esperanza de vida).

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

El área de estudio forma parte de la región centro-sur de la Sierra de Comechingones, departamento de Calamuchita. Este distrito agrupa manifestaciones y yacimientos de fluorita emplazadas en el batolito de Cerro Áspero-Alpa Corral, un complejo granítico de 440 km² de extensión, de forma elipsoidal, ubicado en el departamento Calamuchita, delimitada entre los paralelos 32° 21' 52" y 32° 47' 32" S; y los meridianos 64° 55' 45" y 64° 44' 25" W (Fig. 1). En el mismo, se encuentra ubicada la Mina de fluorita Los Cerros Negros (CN), la única en actividad en Argentina, que ocupa una superficie de 1 km² y una altitud aproximada de 1200 metros sobre el nivel del mar (Andreazzini, 2002; Coniglio, 2006).

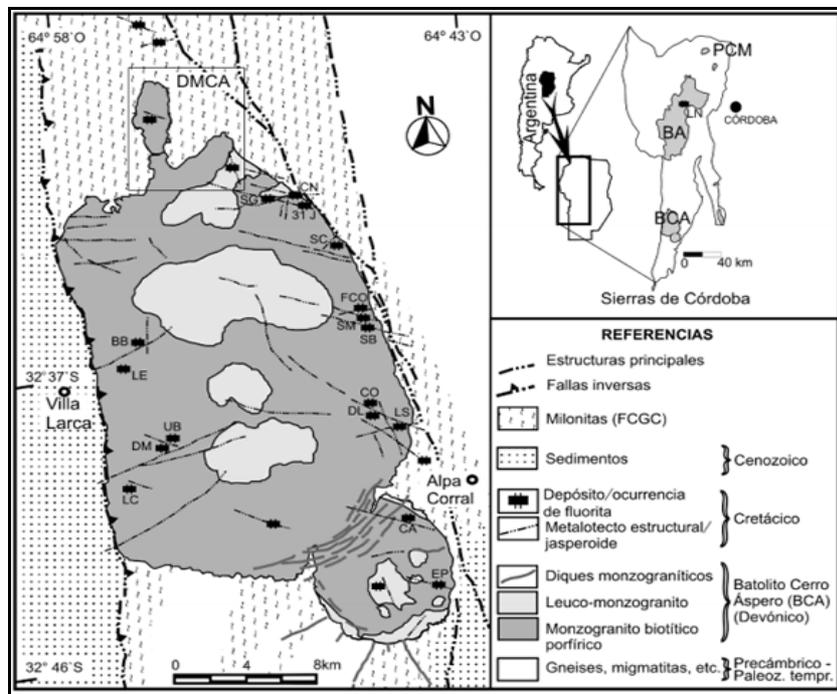


Figura 1. Geología del batolito Cerro Áspero (BCA) y ubicación de los principales depósitos de fluorita. Figura extraída de Coniglio *et al.*, (2006).

El grupo los Cerros Negros está localizado sobre el faldeo oriental de la Sierra de Comechingones, en el extremo sureste del distrito minero Cerro Áspero. De acuerdo a Coniglio *et al.*, (2010) el batolito Cerro Áspero contiene en promedio 1,210 mg/Kg de F, que es dos veces más elevado que el de la roca metamórfica encajante y que el de otros granitos no mineralizados de las sierras de Córdoba. En la actualidad la mina Los Cerros Negros es la única que se encuentra en producción desde 1991 (Coniglio, 2006), ocupa

aproximadamente una superficie de 1 km² a una altitud de 1200 metros sobre el nivel del mar.

3.1.1. Caracterización de la zona de estudio:

*Clima:

Climatológicamente se ubica dentro del dominio semi-húmedo, con tendencia al semi-seco de la llanura y la montaña, con déficit de agua en invierno; se encuentra encerrada dentro de la isoterma media de 19 °C, la isoterma máxima media de 20 °C y la isoterma mínima media de 16 °C (Oggero y Arana, 2012). Según Capitanelli (1979) en los sistemas montañosos de la provincia (picos y pampas de altura) las mayores precipitaciones ocurren en el periodo estival con precipitaciones de 800 a 900 m.m.

*Vegetación:

Según la descripción fitogeográfica de Cabrera (1994) la zona de estudio pertenece al distrito Chaqueño Serrano. La vegetación dominante es el bosque xerófilo, alternado con estepas de gramíneas duras distribuyéndose en pisos escalonados según la altura. (Oggero y Arana, 2012). En las quebradas y faldeos abruptos abundan los tabaquillos (*Polylepis australis*). En las zonas más elevadas hay grandes extensiones cubiertas por coirón (*Festuca pallescens*). Existen además especies vegetales del germoplasma nativo con valor económico, especialmente del grupo de las plantas medicinales y aromáticas donde se han registrado más de setenta especies. Fuera de la vegetación autóctona o semiautóctona se encuentran los extensos pinares, favorecidos por el clima y el suelo de la zona.

*Litología:

En la zona de estudio se distinguen dos ambientes litológicos principales: a) Metamórficos y B) Granítico. Los cuales controlan el paisaje natural del área ya que la intervención antrópica es casi nula y sólo se encuentran algunos puestos serranos muy aislados.

El paisaje es fuertemente ondulado en toda la cuenca destacándose un sector muy alto conformado por bloques graníticos llamado Batolito Cerro Áspero (BCA) y un sector más bajo constituido por rocas metamórficas. Dentro del BCA se diferencian morfologías muy variadas caracterizadas por bloques altos de paredes subverticales y relieves redondeados (Villalva *et al.*, 2000). Una de las características naturales de las rocas graníticas del batolito Cerro Áspero es su riqueza en flúor (Andreazzini, 2002).

**Hidrología Superficial:*

El área de estudio comprende arroyos de la cuenca imbrífera superior del río Ctalamochita (Tercero) perteneciente a la *subcuenca* Carcarañá. Esta subcuenca está formada por arroyos que nacen entre los 800 y los 1500 m s.n.m. en la falda oriental de las Sierras de los Comechingones en la provincia de Córdoba (Argentina). Los cursos de agua se caracterizan por un régimen de tipo torrencial, donde en épocas de caudal pico se suma gran cantidad de sedimentos de granulometría variada (Cabido *et al.*, 2003).

En cuanto a la hidrología superficial, La cuenca del A° Los Cerros Negros posee una forma aproximadamente triangular, con una superficie de alrededor de 10 km². Este, recorre la litología granítica de oeste a este, desde una cota de 1500 hasta 1170 msnm. en el el sector de las instalaciones del yacimiento recibe al A° Los Vallecitos, de rumbo N-S, el que proviene desde la roca metamórfica, con una superficie de 3.5 km² y una pendiente general del 5 %. Luego sigue sobre roca metamórfica con un rumbo general SE, para volcar sus aguas al río Guacha Corral (Fig. 2). Este último es el curso más importante del área y, se encuentra fuera de la zona de estudio.

Las divisorias de agua son netas y claras, controladas por la abrupta topografía. En la cuenca se desarrolla principalmente por escurrimiento superficial, ya que el subterráneo se encuentra limitado a los pequeños valles intermontanos y al medio fracturado.

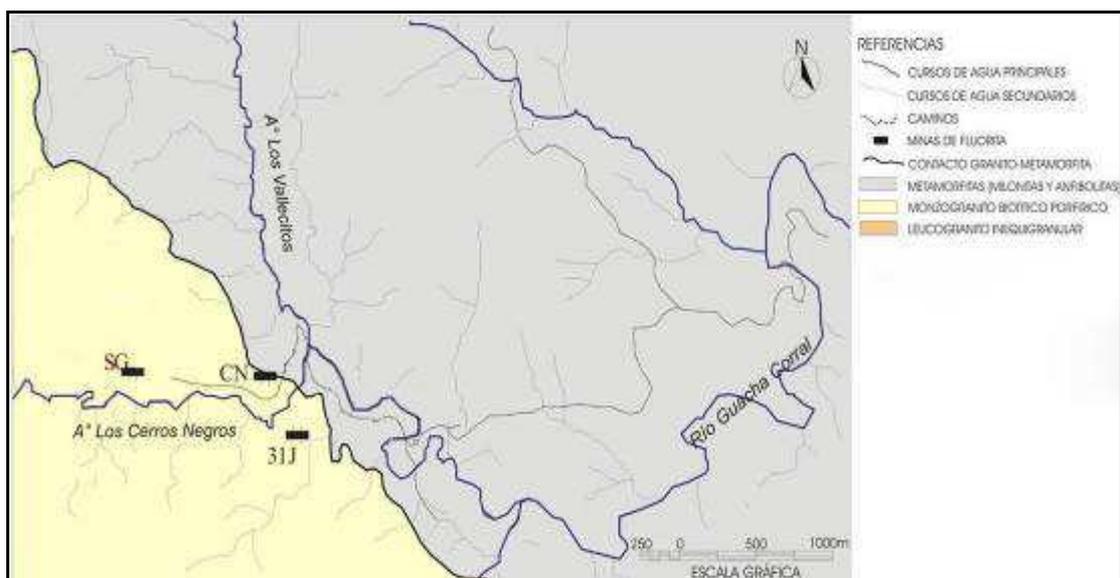


Figura 2. Localización de la mina Cerros Negros (CN) y de las principales redes hídricas de la zona de estudio. Figura extraída de Andreazzini (2002).

3.1.2. Método de explotación de la mina y proceso de tratamiento del mineral

La actividad económica más importante de la región corresponde a la actividad minera. Esta consiste principalmente en la explotación de fluorita en el yacimiento Cerros Negros, aproximadamente a 25 km de la localidad de Río de los Sauces (Andreazzini, 2002).

La actividad extractiva del mineral se realiza a cielo abierto desde el año 2004, pero con anterioridad se practicó de forma subterránea por el método de realce (Fig. 3). La mina Los Cerros Negros posee una planta de tratamiento mineral que incluye el sector de trituración primaria y secundaria con capacidad de tratamiento de 1.500 toneladas mensuales. Además cuenta con 6 Piletas de decantación de los efluentes que resultan del proceso (Coniglio, 2006; *comunic per* Martinez J. M) (Fig. 2).



Figura 3. Zona de extracción y trituración. Foto: Manuel A. Otero

Para la extracción del mineral se utilizan explosivos, maquinaria especial, (barrenos, martillos neumáticos, entre otros), y el material extraído se transporta en camiones hacia la planta de tratamiento. El método que se utiliza para concentrar la fluorita es el de **flotación**, proceso físico de concentración, que utiliza reactivos químicos capaces de producir espuma que reduce la tensión superficial y hace flotar el material de interés, permitiendo que los materiales no deseados decanten (*comunic per* Martinez J. M).

El proceso consiste primero en una tritución de la fluorita ingresando a la planta de flotación con un tamaño inferior a los 12 mm (Fig. 4 a), luego se le agrega Soda caustica para elevar el pH a 9 (Fig 4 b) y Silicato de Sodio para generar una burbuja alrededor de la fluorita (Fig 4 c). Posteriormente se pasa a un molino y luego a una centrifuga para lograr una granulometría de 0,15 mm. A la mezcla que se genera al principio del proceso (fluorita + Soda caustica + Silicato de Sodio) se le agrega acido oleico, un acido orgánico graso, que permite la flotación (Fig 4 d). El material flotado se va retirando por canaletas y el resto se dirige a las Piletas de decantación. Luego dicho material va pasando por una serie de celdas donde va cambiando de color grisaceo a violeta. En las ultimas celdas se le agrega nuevamente Silicato de Sodio para lograr un pH entre 7,5 y 8 (*comunic per* Martinez J. M).



Figura 4. A) Planta de tritución de fluorita hasta los 12 mm. B) Tanques donde se le agrega soda caustica para elevar pH. C) Celdas de flotación. D) Separación de la fluorita flotada. Foto: Adolfo L. Martino

Por otra parte el material ya concentrado se le adiciona acido acético (8 a 10%) cuya función es disminuir el pH a 5 para acelerar su decantación. Una vez logrado el paso anterior, el material pasa a un filtro a vacio (tambor giratorio) (Fig 5 a) donde la fluorita

con un aspecto de talco liliáceo con escasa humedad, termina de secarse por medio de un horno (Fig 5 b). Finalmente la fluorita, con una pureza del 97%, es almacenada en silos (Fig 5 c) y embasada en bolsones de 1000 kg para su comercialización (Fig 5 d) (*comunic per* Martinez J. M).

Los efluentes que se generan durante el proceso son dirigidos hacia las Piletas de decantación que son presas de tierra sobre elevadas unos 3 m sobre el A° Cerros Negros y tienen un tamaño aproximado de 15 m por 25 m cada una. Las 6 Piletas se encuentran conectadas entre sí (Fig. 6), donde el agua por desnivel termina en un tanque de tipo australiano el cual posee una bomba que hace recircular el agua de nuevo a la planta. Las ultimas 3 Piletas se encuentran vegetada con juncos (*Typha sp.*).



Figura 5. Proceso de secado de la Florita. A) Filtro de vacío, B) Horno de secado de la fluorita, C) Silos de almacenamiento y D) bolsones de fluorita fluotada lista para comercializar. Foto: Adolfo L. Martino.



Figura 6. Piletas de decantación. Foto: Adolfo L. Martino

3.2. Sitios de muestreo

Para la elección de los sitios de muestreo (Fig. 7), se considero al agua superficial como el de mayor interés a evaluar, debido a que el emprendimiento minero se ubica en los alrededores de la unión de los dos arroyos más importantes de la cuenca, el A° Los Cerros Negros, Los Vallecitos y sus respectivos efluentes, ya que el agua de estas redes hídricas es utilizada para el funcionamiento de la planta de tratamiento que incluye la trituración primaria, secundaria y el proceso de flotación.

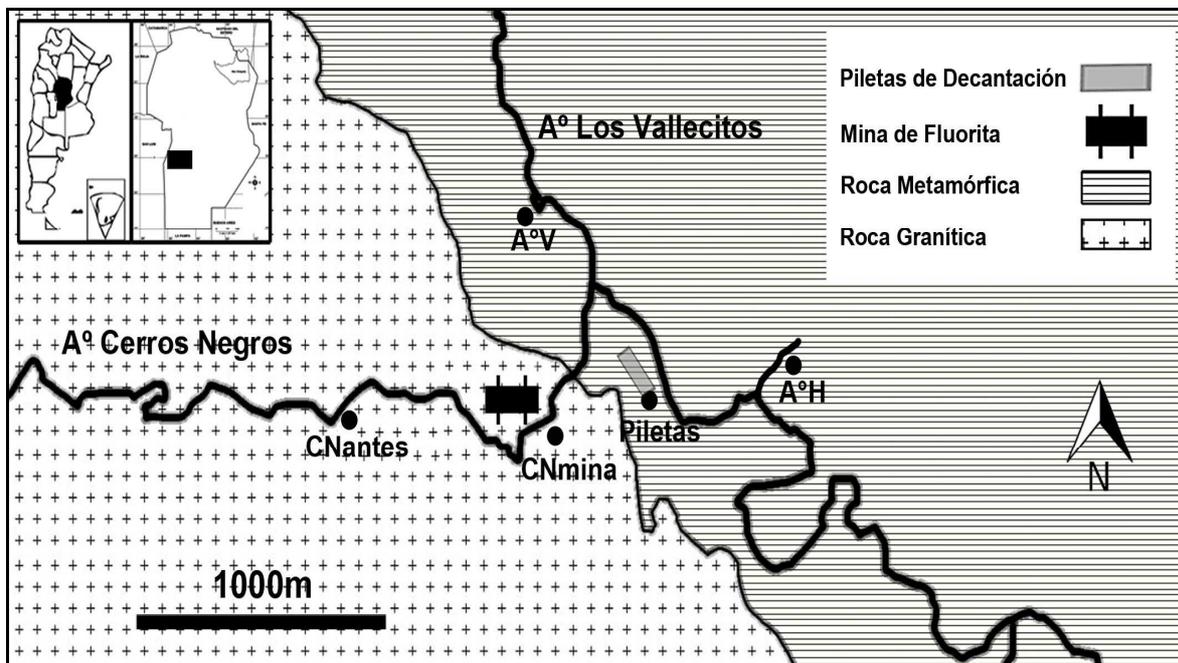
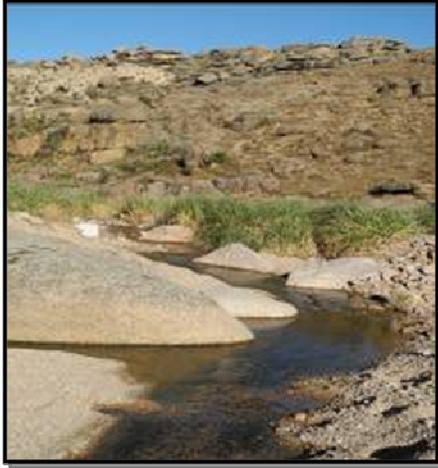


Figura 7. Mapa con los sitios de muestreo seleccionados según las características del agua superficial y del nivel de actividad antrópica desarrollada.

Los sitios relevados en este estudio son:

- 1) Arroyo Cerros Negros Negro aguas arriba de la explotación minera (**CNantes**). La elección de este sitio se debió a que el mismo nace y discurre sobre roca granítica y posee altas concentraciones de flúor natural sin influencia de la actividad de la mina Cerros Negros (Fig. 8 A).
- 2) Arroyo Cerros Negros aguas debajo de la explotación minera (**CNmina**). Circula sobre roca granítica y se seleccionó para monitorear las características naturales del curso sumado a los cambios producidos por la actividad minera (Fig. 8 B). Agua debajo de este tramo el arroyo se une al Arroyo Vallecitos. Las observaciones fueron realizadas después de atravesar la planta de molienda cerca del campamento minero.
- 3) Piletas de decantación (**Piletas**) vegetadas con juncos (*Typha sp.*) (Fig. 8 C). Son presas artificiales de tierra sobre elevadas unos 3 metros próximos al arroyo Los Cerros Negros y tienen un tamaño aproximado de 15 metros por 25 metros cada una. Las 6 piletas se encuentran conectadas entre sí, donde el agua por desnivel termina en un tanque de tipo australiano el cual posee una bomba que hace recircular el agua de nuevo a la planta aprovechando aproximadamente el 80% de esa agua.
- 4) Arroyo Los Vallecitos (**A°V**). Arroyo que nace y discurre sobre roca metamórfica por fuera del batolito granítico Cerro Áspero con bajo contenido de flúor natural y se une aguas abajo al arroyo Cerros Negros (Fig. 8 D).
- 5) Arroyo Las Hylas (**A°H**). Denominado así por no tener nominación previa. Sitio de referencia que discurre sobre roca metamórfica por fuera del campamento sin relación alguna con la actividad minera (Fig. 8 E). Es un arroyo de primer orden con escasa velocidad de corriente y la mayor parte de su caudal se encuentra totalmente vegetado con *Hydrocotyle sp.*



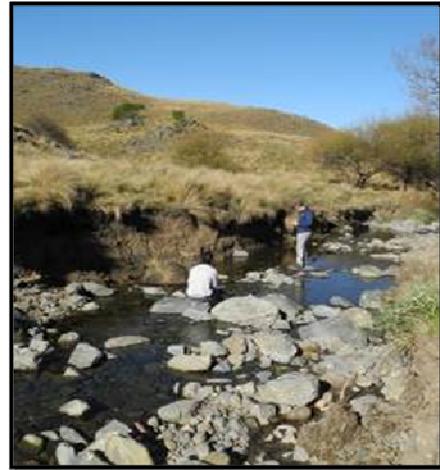
A) A° Cerros Negros antes de la instalación minera (CNantes)



B) A° Cerros Negros aguas debajo de la instalación minera (CNmina)



C) Piletas de decantación (Piletas)



D) Arroyo Los Vallecitos (A°V)



E) Arroyo las Hylas (A°H)

Figura 8. Sitios de muestreo incluidos en este estudio. Fotos: Adolfo L. Martino

3.3. Caracterización de los sitios de estudio

Cada sitio seleccionado para realizar los muestreos, fue georeferenciado con GPS Garmin Etrex 10 y se determinó la distancia de los mismos al campamento minero. Se realizaron mediciones de variables hidráulicas como profundidad del cauce, ancho del cauce y velocidad de corriente siguiendo las recomendaciones de Corigliano (2008). Además, se caracterizaron los márgenes de los cursos de agua de acuerdo a la pendiente y altura de las barrancas y terrazas de inundación. En cuanto a la vegetación de cada sitio, se determinó el porcentaje de cobertura del suelo, la estructura de dicha cobertura y la altura aproximada de la vegetación; según Gualdoni *et al.*, (1994) y Corigliano (2008). En el recorrido de los sitios se determinó de manera visual la presencia de especies animales exóticas y las actividades antrópicas desarrolladas. En cada sitio de estudio, el nivel de perturbación de los hábitats terrestres y acuáticos circundantes se midió en una escala arbitraria de 0 - 5 (Peltzer, 2006, adaptado de Pavignano, 1988), donde 0 corresponde a un sitio natural sin alteraciones, y 5 para un sitio completamente alterado por crecidas repentinas, animales domésticos, actividad humana (camino, agricultura, deforestación, excavación, fuego intencional, maquinaria pesada), etc.

3.3.1. Calidad de agua

Las variables ambientales que se relevaron *In situ* fueron: temperatura del aire (a 1 m del suelo) y del agua; pH, conductividad, salinidad y sólidos disueltos totales con equipo digital 35-Series PCSTestrTM Multiparámetro 35425-10. El oxígeno disuelto fue medido en cada sitio mediante oxímetro digital meter HD3030. Además, las precipitaciones y temperaturas mensuales fueron provistas por la empresa Fluorita Córdoba quien cuenta con una estación meteorológica en el campamento minero.

Se tomaron muestras de agua a profundidad media teniendo precaución de no poner en suspensión los depósitos sedimentados, utilizando recipientes de plástico, en cada sitio de muestreo en las distintas estaciones del año con la finalidad de realizar un análisis físico-químico de cationes y aniones principalmente de flúor (F^-), según lo registrado previamente por Andreazzini (2002). Todas las muestras de agua fueron tomadas, transportadas y analizadas de acuerdo a APHA (2005). Se realizó la determinación de flúor por potenciometría, utilizando un electrodo de ión selectivo. La clasificación geoquímica se realizó por medio de diagramas de Piper Hill. El análisis de agua se realizó mediante un

analizador Palintest® en el área de Hidrología, departamento de Geología, Universidad Nacional de Río Cuarto.

3.4. Ensamble de anfibios

El trabajo de campo se llevó a cabo de manera sistemática (cada quince días) durante la época de mayor actividad reproductiva de los anfibios (Septiembre – Abril). Para los muestreos se utilizó la metodología de relevamientos por transectas acústicas (Zimmerman, 1994) y encuentros visuales (Heyer *et al.*, 1994), que consisten recorrido fijo por el borde de los cuerpos de agua con una extensión de 200 m. Las recorridas nocturnas incluyeron búsquedas activas para detectar anuros que no están vocalizando y para escuchar machos vocalizadores. Las búsquedas nocturnas comenzaron poco después de la puesta del sol (19:00 h) y se extendió hasta la medianoche. Además, se visitaron los sitios durante el día para registrar la presencia de puestas y larvas de las distintas especies (capturadas mediante el uso de redes de mano). Cuando fue necesario, las larvas colectadas fueron criadas y llevadas a metamorfosis en laboratorio para su correcta identificación; luego fueron devueltas a su hábitat natural. La abundancia de cada especie fue considerada de acuerdo a las consideraciones de Parris (2004), como el número máximo de individuos contabilizados en los muestreos, ya que los valores observados de abundancia máxima ofrecen un indicador razonable de la abundancia relativa de las distintas especies en un momento dado.

Para describir los ensambles de anfibios de los distintos sitios de muestreo se estimaron diferentes parámetros utilizando las ecuaciones de Magurran (Magurran, 2005): Riqueza de especies (S), Diversidad utilizando el Índice de Shannon (H) y Equitatividad (E). Debido a que las muestras analizadas presentaron valores de abundancias diferentes entre los sitios, se utilizó la técnica de rarefacción para comparar la diversidad y riqueza media (Hamann *et al.*, 2006; Duré *et al.*, 2008). Esta técnica permite la comparación de riqueza y diversidad en diferentes ambientes, independientemente del tamaño de la muestra. Además, el tamaño de la muestra se evaluó mediante las curvas de rarefacción, confeccionadas a través del cálculo de índices Chao 1, utilizando el software Estimates versión 9.1.0 (Colwell, 1997). La diferencia de diversidad de especies entre sitios se evaluó mediante análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el software infostat (Di Rienzo *et al.*, 2012). Utilizamos el Índice de similaridad de Sorensen para medir la similitud en la

composición de especies (Ss) y la abundancia (Cn) entre sitios. Este índice resume la similitud entre las comunidades en una escala de 0 a 1, donde un valor de 1 indica una completa similitud en composición de especies, mientras que un valor de 0 indica completa disimilitud.

Para analizar la asociación entre hábitat y variables espaciales a través de una matriz de correlación basada en los recuentos de anuros, se implementó un análisis de correlación canónica utilizando el programa CANOCO versión 4.5. La variable respuesta analizada fue la presencia de cada especie en cada uno de los sitios estudiados. Las variables ambientales de los cuerpos de agua incluyeron: variables fisicoquímicas (temperatura del agua; pH, conductividad, OD), concentración de iones promedio (Cl⁻, F⁻, As, etc), porcentaje de cobertura vegetal en los márgenes de los cuerpos de agua y velocidad de corriente media de los arroyos.

3.5. Crecimiento y desarrollo larval

Para evaluar el efecto de la actividad minera sobre el crecimiento y desarrollo larval se realizaron experiencias de laboratorio (microcosmos) y experiencias a campo. Se utilizaron larvas de la especie *Rhinella arenarum* por su reconocida sensibilidad, elevado número y alta homogeneidad de individuos (Bosch *et al.*, 2011; Lajmanovich *et al.*, 2014). También, la facilidad y economía de la obtención del material y del mantenimiento de las larvas en laboratorio (Kwet *et al.*, 2004).

Descripción de *Rhinella arenarum*

Sistemática

La nomenclatura utilizada en la clasificación de la especie fue tomada de Frost, (2018).

Orden: ANURA

Familia: Bufonidae

Género: *Rhinella*

Espécie: *Rhinella arenarum* Hensel, 1867

Nombre Vulgar: sapo común (Fig. 9)

Características generales



Figura 9. A) Pareja de *R. arenarum* en amplexo y B) Grupo de larvas. Sitio Piletas de decantación. Fotos: Favio E. Pollo

Descripción: El sapo común presenta un tamaño mediano a grande (80 a 120 mm), siendo las hembras de mayor tamaño que los machos. La cabeza es levemente cóncava con el hocico redondeado con crestas cefálicas y ojos prominentes. Presentan un tímpano visible y redondo, una cresta a lo largo del labio superior y glándulas paratoides alargadas, seguidas por glándulas verrugosas. El macho tiene patas delanteras robustas, saco vocal externo azulado y callosidades nupciales en los dedos 1, 2 y 3 de la mano. La coloración dorsal del macho es parda o verdosa, mientras que la hembra grisácea o parda brillante, con grandes manchas pardas o verde oscuro. El vientre es blancuzco. La larva presenta el extremo de la cola redondeado y la aleta no se extiende sobre el dorso. Es de color negro y se la puede encontrar en ríos, arroyos, lagunas y charcas temporarias (Cei, 1980; Gallardo, 1987).

Hábitat y Ecología: Se los puede encontrar en pequeñas lagunas o pantanos con agua estancada (preferentemente) en zonas abiertas incluso en ambientes urbanos. Los machos cantan tanto de día como de noche luego de lluvias copiosas desde la primavera hasta final del verano. Las hembras colocan sus huevos, de color negro, en ristras gelatinosas que adhieren a la vegetación sumergidos en el agua. En invierno se entierra o refugia en cuevas (Cei, 1980; Gallardo, 1987).

Distribución: Esta especie se encuentra en el sur de Brasil, Uruguay, Bolivia y hasta el sur de Argentina, desde el nivel del mar hasta los 2.600 m. s.n.m.

3.5.1. Crecimiento y Desarrollo larval (Experiencia en microcosmos)

Los sitios que se analizaron son: (1) Arroyo Cerros Negros antes de la mina (**CNantes**), (2) Arroyo Cerros Negros después de la mina (**CNmina**), (3) Arroyo Vallecitos (**A°V**), (4) Piletas de decantación (**Piletas**), (5) Control (agua destilada). De cada sitio de muestreo se extrajo sedimento grueso (arena gruesa, cantos rodado y pequeñas rocas) y agua en bidones de 10 litros cada vez que se realizaron campañas de muestreo. Luego en laboratorio se realizaron análisis Físico-Químico del agua para conocer las concentraciones de aniones y cationes con los que se realizó la experiencia.

Los microcosmos consistieron en peceras de vidrio de 25 litros de capacidad equipados con oxigenador (Elite 800). En cada pecera se colocaron 15 lt de agua con rocas y sedimento provenientes de cada sitio (Fig. 10). Los sitios tratamiento se replicaron tres veces por lo que se utilizaron 15 peceras en total. Recambios del agua de los microcosmos fueron realizados semanalmente, con agua proveniente de los distintos sitios. Las larvas fueron alimentadas con *Taraxacum sp.* hervido por microcosmos, cada dos días, de modo que las larvas dispusieron de alimento de forma constante.

Con el objetivo de descartar el efecto genético de posibles implicancias de los diferentes ambientes sobre los primeros estadios de *R. arenarum* se siguieron las recomendaciones de Peltzer *et al.*, (2013). Para ello se colectó una puesta del sitio Piletas que fue llevada al laboratorio y se la mantuvo a temperatura ambiente (23–25 °C) hasta que las larvas reabsorbieron su saco vitelino y alcanzaron el estadio 25 de acuerdo con Gosner, (1960). Posteriormente se seleccionaron al azar 50 larvas de *R. arenarum* y fueron colocados en cada pecera (Fig. 10), resultando en una densidad dentro del rango encontrado en la naturaleza (14-4200 larvas/1000 litros; Werner y Glennemeier, 1999). A partir de ese momento dio comienzo la experiencia.

Las peceras fueron revisadas diariamente para corroborar la presencia de individuos muertos; en este caso se los contaba, se extraían de las peceras y fueron fijados en formol buffer. Con una frecuencia de entre 4 – 7 días se extrajo una muestra de 2 individuos tomados al azar de cada pecera. Las larvas fueron anestesiadas y fijadas en formol buffer. Además se realizaron medidas Físico-químicas del agua de cada pecera con equipo digital 35-Series PCSTestrTM Multiparámetro 35425-10 para monitorear las características del microcosmo. A todos los individuos extraídos se les determinó el estadio según Gosner,

(1960), se los peso y se midió largo total, largo del cuerpo, ancho del cuerpo y alto del músculo de la cola.

La experiencia se extendió hasta que todos los individuos metamorfosearon o murieron. Los individuos metamorfoseados fueron extraídos de las peceras anestesiados y fijados en formol buffer; fueron considerados metamorfos desde la etapa 42 (Gosner, 1960) cuando los renacuajos han perdido su características larvales y adquieren estructuras adultas, es decir, la emergencia de al menos alguna extremidad anterior (Peltzer *et al.*, 2013). Posteriormente, a estos se les determinó el Peso con balanza analítica, se midió el largo hocico cloaca (LHC) y a partir de dichos parámetros se les determinó la condición corporal (CC).



Figura 10. Serie de peceras utilizadas en la experiencia (microcosmos). Foto: Manuel A. Otero.

3.5.2. Crecimiento y desarrollo larval IN SITU

Para evaluar el efecto de la actividad minera sobre el desarrollo y la condición corporal de las larvas, se realizó una experiencia a campo en donde se evaluaron estas características. Los sitios evaluados fueron las Piletas y A°V por ser relativamente de fácil acceso y con la mayor estabilidad para asegurar la continuidad de la experiencia. Al igual que en la experiencia de laboratorio se siguió las recomendaciones de Peltzer *et al.*, (2013); para evitar el posible efecto genético se colecto una puesta del sitio Piletas y fue mantenida a temperatura ambiente (23–25 °C) hasta que reabsorbieron su saco vitelino y alcanzaron

el estadio 24 de acuerdo con Gosner, (1960). Luego fueron ubicadas en estructuras denominadas “de exclusión” utilizadas por Acosta, (2009) (Fig. 11). Se colocaron un total de 100 larvas en cada estructura. Cada 8-10 días se extrajo de cada sitio de manera simultánea una muestra de 5 larvas que fueron anestesiadas en cloroetano, fijadas y preservadas en buffer fosfato, con el objeto de constatar el avance general del desarrollo larval a lo largo del tiempo. En laboratorio se determinó el estadio según Gosner (1960), se midió la longitud Total desde el rostro a la punta de la cola (LT), largo del cuerpo, ancho del cuerpo, alto del músculo de la cola y se obtuvo el peso con una balanza Mettler P11N 0-1000g.



Figura 11. Jaulas de exclusión utilizados para realizar la experiencia a campo. Foto: Selene Babini

3.5.3. Condición corporal y tasas de crecimiento

Los siguientes índices se aplicaron tanto para la experiencia en laboratorio como en la experiencia *IN SITU* en el establecimiento minero.

A partir del LT y la masa de las larvas, se calculó la condición corporal (CC) de los individuos en cada sitio durante diferentes estadios del desarrollo larval utilizando la siguiente fórmula propuesta por Luddecke (2002):

$$CC = (P) \cdot (1000) / LT^3$$

Donde:

CC = Condición Corporal

P = Peso

LT = Largo Total

Para calcular las tasas de crecimiento y desarrollo larval de los diferentes sitios se utilizaron ecuaciones siguiendo las recomendaciones de Teplitsky *et al.*, (2003) y Peltzer *et al.*, (2013).

Tasa de desarrollo:

$$\frac{(\text{estadío final} - \text{estadío inicial})}{\text{n}^\circ \text{ de días de la experiencia}}$$

Tasas de crecimiento:

$$\exp \left(\frac{\text{Ln} [\text{Peso final/Peso inicial}]}{\text{n}^\circ \text{ de días de la experiencia}} \right)$$

$$\exp \left(\frac{\text{Ln} [\text{CC final/CC inicial}]}{\text{n}^\circ \text{ de días de la experiencia}} \right)$$

3.6. Esfuerzo reproductivo

Se registró el número de puestas de huevos observadas en el campo y sólo para aquellas puestas que mantengan la forma de cordones, se calculó el peso siguiendo las recomendaciones de Bionda *et al.*, (2011). Antes de ser devueltas las puestas al agua, se extrajo aproximadamente el 5 % del peso total, se conservó en buffer fosfato (pH 7.2-7.3) y se trasladaron al laboratorio para el conteo del número de huevos y el registro del diámetro de los mismos usando una lupa binocular Zeiss West Germany 47 50 52-9901 y cámara digital Canon G10. De este modo, se realizaron comparaciones entre la densidad de puestas, el tamaño de la puesta y el número de huevos por puesta como medida de esfuerzo reproductivo siguiendo a Weddeling *et al.*, (2005).

3.7. Morfometría y demografía de poblaciones adultas

3.7.1. Metodología de campo

Se trabajó con las especies *Rhinella arenarum* y *Boana cordobae* por ser entidades que se encuentran presente en nuestra área de estudio (di Tada, 1999), además de ser consideradas abundantes y de fácil captura (Lavilla *et al.*, 2000).

Descripción de *R. arenarum*, ver pag. 29.

Descripción de *Boana cordobae*

Sistemática

La nomenclatura utilizada en la clasificación de la especie fue tomada de Frost, (2018).

Orden: ANURA

Familia: Hylidae

Género: Boana

Espécie: *Boana cordobae* Barrio, 1965

Nombre Vulgar: Ranita trepadora (Fig. 12)



Figura 12. A) Macho *B. cordobae*, vista lateral B) Macho de *B. cordobae*, vista dorsal. Fotos: Pablo R. Grenat

Características generales

Descripción: El adulto de *B. cordobae* es de tamaño mediano (45-65 mm) con un pliegue timpánico acentuado. Presentan una gran variedad en cuanto a los patrones de coloración según su localización en la provincia, el dorso puede variar desde pardo canela

al verde, liso o con un manchado dorsal reticulado con otras manchas, las bandas laterales están ausentes tanto en los flancos como en las extremidades.

Las larvas son de desarrollo lento, muy buenos nadadores. En cuanto a su coloración el dorso y flancos son de color marrón con manchas más oscuras. Los ojos se encuentran en posición lateral con dos manchas blancas por detrás. El vientre es oscuro en la parte anterior y de color nacarado en la parte posterior. Aleta caudal muy desarrollada, con grandes manchas y de punta aguda (Baraquet, 2012).

Hábitat y Ecología: Habita en los márgenes de arroyos y ríos serranos, vive entre pajonales y vegetación periacuática, siendo frecuente encontrarla sobre piedras en las horas de mayor insolación. Esta especie emite su canto desde la vegetación de la orilla o puede hacerlo también parcialmente sumergida en el agua. Sus ciclos reproductivos son casi continuos, adhiriendo los huevos a la vegetación que se encuentra sumergida y enraizada. La época reproductiva transcurre desde la primavera hasta el fin del verano, incluso a comienzos del otoño encontrándose formas larvales durante la primavera y verano e incluso en otoño e invierno (Ceí, 1980; Gallardo, 1987).

Distribución: Se distribuye en las sierras altas de Córdoba y San Luis, desconociéndose con precisión los límites de su área, sobre todo en la zona de contacto con *H. pulchellus* (Ceí, 1980; Gallardo, 1987; Baraquet, 2012).

Keller *et al.*, (2009) sugiere que las características especie-específicas, dependiendo si son de hábitos terrestres, arborícolas o acuáticos, pueden explicar en mayor o menor medida un efecto negativo en la población si una alteración en el ambiente ocurre. Las especies seleccionadas para el estudio son adecuadas ya que, *R. arenarum* posee hábitos terrestres en sus actividades reproductivas y alimentarias, mientras que *B. cordobae* posee hábitos arborícolas y semiacuáticas. Además, la elección de estas especies permite realizar un estudio más integrado a diferentes escalas espacio-temporales ya que, *R. arenarum* se reproduce desde Septiembre a Febrero utilizando principalmente ambientes lenticos para vocalizar y reproducirse (Bionda *et al.*, 2011; Babini *et al.*, 2015a) En invierno se entierra o refugia en cuevas (Ceí, 1980; Gallardo, 1987). Mientras que *B. cordobae* se reproduce desde Octubre a Mayo en ambientes lóticos utilizando la vegetación marginal para vocalizar y reproducirse (Ceí, 1980; Gallardo, 1987; Baraquet *et al.*, 2012).

Una vez realizada la captura manual de los individuos, estos fueron anestesiado durante unos minutos con un MS 222 (solución de metanosulfonato de triclaína) y posteriormente se 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 Total (largo desde el rostro hasta la cloaca), utilizando un calibre manual Vernier SometInox Extra (0.01 mm precisión).

Para el marcado y obtención de muestras óseas de cada individuo se procedió al corte de una falange utilizando un patrón de identificación para cada sitio estudiado (Fig. 13) siguiendo las recomendaciones de Donnelly *et al.*, (2004). Dicha marca permitirá realizar un seguimiento de los individuos de cada sitio, además de indagar la independencia de las poblaciones de anfibios anuros estudiados, permitiendo también disponer de una muestra ósea para los análisis de determinación de la edad mediante esqueletocronología. Las falanges fueron conservadas en una solución de alcohol al 70%. Pomada Antibiótica con agentes cicatrizantes, se agregó en la herida producida por el corte para prevenir infecciones, y cada individuo fue liberado 2 h más tarde en sus lugares de captura.

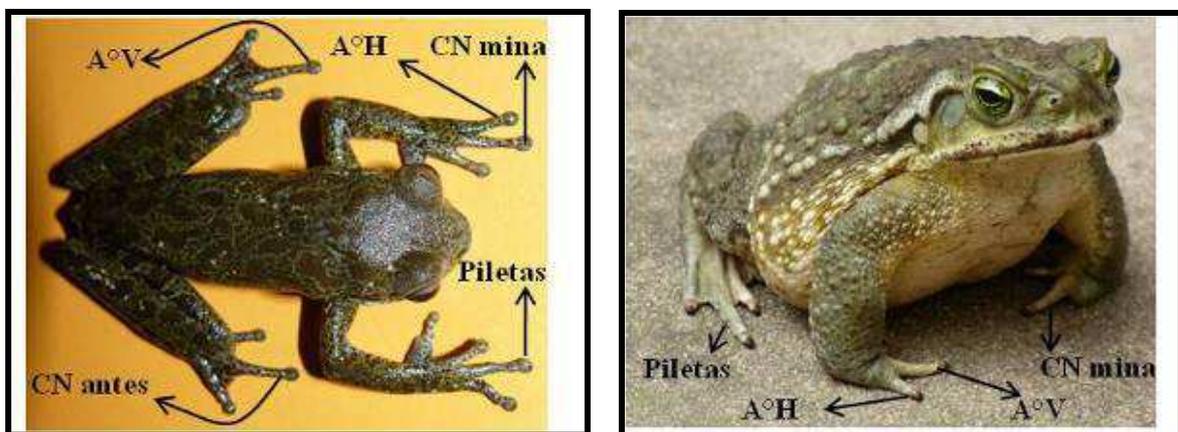


Figura 13. A) Ejemplar de *H. cordobae*. B) Ejemplar de *R. arenarum*. Dedos seleccionados para obtener muestra ósea e identificar el sitio de procedencia. Fotos: Pablo R. Grenat

3.7.2. Metodología de laboratorio

El análisis de esqueletocronología se utilizó para determinar la edad específica en cada individuo capturado, siguiendo para su procesamiento la técnica descrita por Sinsch

et al., (2001, 2002) y Otero *et al.*, (2017a). Se incluyen en este análisis individuos recién metamorfoseados, juveniles y adultos de *Rhinella arenarum* y *Boana cordobae*

Debido a que los anfibios presentan períodos estacionales de hibernación/estivación, el crecimiento de los tejidos óseos se detiene o disminuye, formándose líneas de detención del crecimiento o LAGs (Line Arrested of Growth). Los LAGs pueden ser identificadas y contadas en cortes histológicos previamente teñidos. Para esto, se utilizaron las falanges obtenidas en el proceso de marcado de los individuos capturados en el campo.

Para el procesamiento de las falanges se llevo a cabo el siguiente procedimiento: 1.) FIJACIÓN en Formol al 4% por 24 horas; 2.) DESCALCIFICACIÓN en solución ácido fórmico (1:1) durante 24 hs; 3.) Lavado con agua destilada para la remoción de calcio durante 2 o 3 hs; 4.) INCLUSIONES: se procesaron las muestras en una serie de alcoholes en concentraciones crecientes a fin de deshidratarlas para su posterior inclusión, luego en alcohol 100%-xilol una hora, seguido de varias inmersiones en xilol al 100%, xilol-parafina una hora, y luego varias inmersiones en parafina durante 20 minutos en estufa hasta llegar a la inclusión definitiva en parafina y el armado del taco (pasos 3 y 4 llevan un total de 7hs); en días posteriores, se realizaron 5.) CORTES transversales de las diáfisis de 8, 10 o 12 μm de espesor mediante el uso de un micrótopo de rotación LEICA RM2125 RTS; 6.) COLORACIÓN se utilizó la tinción con hematoxilina, previamente hidratando los cortes mediante inmersiones en xilol al 100% y luego inmersiones en una serie de alcoholes en concentraciones decrecientes hasta el teñido con hematoxilina; 7.) MONTAJE FINAL: deshidratación definitiva de las muestras utilizando inmersiones sucesivas y breves en alcohol a concentraciones crecientes y dos inmersiones sucesivas en xilol al 100% durante 5 minutos, montaje con Bálsamo de Canadá; 8.) OBSERVACION DE CORTES: mediante un Microscopio Carl Zeiss trinocular Primo Star (Pack 5), y captura de imágenes con una cámara fotográfica Canon Power Shot G10 14.7 Megapíxeles y Software AxioVision CARL ZEISS para cámara fotográfica digital Canon. IDENTIFICACIÓN E INTERPRETACION DE LAGs: Seguimos las recomendaciones de Sinsch, (2015) para estudiar especies neotropicales. Se identificaron líneas dobles y falsas siguiendo Sinsch *et al.*, (2007), y evaluamos la reabsorción endosteal observando la presencia de la línea de Kastschenko (KL, la interfase entre las zonas endosteal y periosteal, Rozenblut y Ogielska, 2005).

Una vez obtenidos los datos de edad en cada individuo para los distintos sitios de muestreo, se procedió al análisis de distintos parámetros demográficos de acuerdo con Bionda *et al.*, (2015) y Otero *et al.*, (2017b): (1) Edad de madurez sexual: Mínimo número de LAGs contados en individuos reproductivos; (2) Longevidad: Máximo número de LAGs contados en individuos reproductivos; (3) Potencial reproductivo: Diferencia entre longevidad y edad de madurez sexual; (4) Tamaño a la madurez sexual: LHC promedio de todos los individuos con el mínimo número de LAGs.

El crecimiento poblacional fue estimado de acuerdo a la ecuación de von Bertalanffy, (1938), previamente usada en muchos trabajos de anfibios (Miaud *et al.*, 2007; Üzüüm y Olgun, 2009; Guarino *et al.*, 2011; Marangoni *et al.*, 2012; Otero *et al.*, 2017a, 2017b). Utilizamos la siguiente ecuación: $LHC_t = LHC_{max} - (LHC_{max} - LHC_{met}) e^{-K(t - t_{met})}$, donde LHC_t = LHC promedio a la edad t , LHC_{max} = LHC asintótico máximo, LHC_{met} = LHC a la metamorfosis, t = números de temporadas de crecimiento (edad), t_{met} = proporción de tiempo de una temporada de crecimiento hasta la metamorfosis, K = coeficiente de crecimiento (forma de la curva de crecimiento). Los parámetros estimados LHC_{max} y K , se muestran con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Las diferencias entre sitios de estudio se analizaron de acuerdo al grado de solapamiento de los intervalos calculados.

Como medida de crecimiento óseo en los individuos de los diferentes sitios de estudio, se realizaron medidas sobre los cortes de hueso (Área ósea total - Área medular = Área absoluta de hueso). Análisis de regresiones se realizaron para determinar la relación entre el área ósea con respecto al tamaño y la edad de los individuos. Análisis de covarianza (ANCOVAs) utilizando la edad como covariable se realizaron para comparar LHC y área ósea entre sexos y sitios de estudio.

La comparación de las variables entre los sitios se llevó a cabo separando los sexos de cada especie, debido a que se demostró dimorfismo sexual en *Rhinella arenarum* (Bionda *et al.*, 2015) y en *Boana cordobae* (Otero *et al.*, 2017a). Todos los análisis estadísticos se realizaron en Statistica 5.0/W software package (Statsoft Inc., USA).

4- RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos a partir de los muestreos realizados en el periodo comprendido entre los años 2014 al 2017. En primera instancia se muestran los resultados relacionados a la descripción y caracterización del área de estudio, y luego los resultados referidos a los organismos asociados, en este caso los anfibios anuros. Este último comprende la caracterización del ensamble (Riqueza, diversidad, etc.), luego se describe el crecimiento y desarrollo larval, y por último, se presenta el crecimiento y la demografía de los anfibios en la etapa terrestre. Todos los resultados se discriminan y comparan entre los diferentes sitios de estudio considerados.

4.1. Sitios de estudio

4.1.1. Caracterización de los sitios de estudio

La accesibilidad a la mina de fluorita fue variable en el tiempo, principalmente debido a las condiciones del camino de montaña que une Río de los Sauces con la mina. Sin embargo, los sitios estudiados dentro de la concesión minera fueron de relativo fácil acceso. En los sucesivos recorridos por los sitios fueron relevadas las variables que permitieron su caracterización y descripción (Tabla 1).

La distancia de los sitios al campamento minero fue variable, siendo el A°H el más distante. En cuanto a las variables hidráulicas; la profundidad y el ancho del cauce fue similar en los Arroyos pero en las Piletas se registro una profundidad muy elevada. Por otro lado, la velocidad de corriente varió entre los sitios, con los valores máximos en CNantes y mínimos en A°H. Las barrancas de mayor altura y las pendientes más pronunciadas se registraron en CNantes y CNmina.

El mayor porcentaje de cobertura del suelo registrado fue en A°V y A°H debido principalmente a la presencia de cortaderas y numerosas especies de gramíneas. Mientras que el menor porcentaje se observó en las Piletas ya que solo se encuentra vegetación palustre semisumergida.

Durante el recorrido de los sitios se registró la presencia de dos especies exóticas principales. En la temporada 2016 – 2017 se registró por primera vez la presencia de individuos adultos de *Lithobates catesbeianus* en las Piletas de decantación. Por otro lado, en CNantes y A°V se registró la presencia de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) en más de una ocasión.

Se registraron diversas actividades antrópicas en los sitios de estudios. A partir de esto, se determinó el nivel de perturbación general de cada sitio (Tabla x) siguiendo la escala propuesta por Peltzer (2006), adaptado de Pavignano (1988). Entre las más importantes podemos citar a la trituración y lavado de minerales, además de la instalación del campamento minero (comedor, sanitarios, habitaciones, cocina, etc), en márgenes del CNmina. Por otro lado, en el sitio Piletas se detectó el proceso de decantación de sedimento derivados del proceso de flotación y gran movimiento de maquinaria pesada. En cercanías del CNantes se detectaron zonas de voladura donde se extraen minerales. Los sitios en los que menos se detectó actividad antrópica fueron A°V (depósito de chatarra y extracción de agua para consumo) y A°H (vado para paso vehicular que atraviesa el arroyo).

Tabla 1. Variables relevadas para la caracterización y descripción de los sitios de estudio.

	CNantes	CNmina	Piletas	A°V	A°H
Coordenadas	32°30'13''S 64°48'14''O	32°30'09''S 64°47'42''O	32°30'11''S 64°47'35''O	32°29'55''S 64°47'44''O	32°30'23''S 64°46'44''O
Distancia del sitio a la mina (m)	1100	150	100	600	1750
Profundidad del cauce (cm)	22	18	200	35	20
Ancho de cauce (m)	4.5	5.5	-	4	2,9
Velocidad de corriente m/min	17,6	10,9	-	8,1	5,6
Barrancas (alto); terrazas y pendiente	Barrancas modificadas (8m) Pendiente alta	Barrancas (5m) Pendiente media/alta	No Pendiente nula	Barrancas (1m) Terrazas amplias Pendiente media/baja	Terrazas amplias Pendiente media/baja
Borde Vegetado (%)	50	30	15	65	85
Tipo y altura de la vegetación	Cortaderas (1.5m)	Cortaderas (1.5m) Arboles (5m)	Juncos (3m)	Cortaderas (1.5m) Gramíneas (0.5m)	Cortaderas (1.5m) Gramíneas (0.5m)
Presencia de especies exóticas	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha)	No	<i>Lithobates catesbeianus</i> (Rana toro)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha)	No
Actividad antrópica	Voladura de suelo y extracción de fluorita	Lavado de sedimento. campamento minero	Decantación de sedimento. Maquinaria pesada	Deposito de chatarra	Paso vehicular
Nivel de Perturbación general	3	4	5	1	1

4.1.2. Calidad de agua

4.1.2.1. Parámetros Físico-Químicos registrados a campo

En cada muestreo se realizó la medición de diferentes parámetros físico-químicos en todos los sitios de muestreo (Tabla 2; Fig. 14). La temperatura del agua mostró variaciones entre sitios ($F_{4,100} = 8.8$; $p < 0.001$), los arroyos mostraron valores similares, mientras que las Piletas de decantación presentaron valores mayores de temperatura.

Tabla 2. Valores medios, desvío estándar, máximo y mínimo de las variables físico-químicas registradas *in situ* en cada sitio de estudio.

Sitio	T. Agua °C	Ph	Solidos disueltos (ppm)	Salinidad (ppm)	Conductividad (µS)	Oxígeno disuelto (%)
CNantes	17,47±3,65 ^A (10,22–22,3)	7,6±0,4 ^A (6,7–8,29)	28,11±6,34 ^A (16,8–38,1)	23,43±3,51 ^A (15,5–28,9)	38,5±9,69 ^A (27,34–53,51)	88,15±1,17 ^A (85,9–89,4)
CNmina	19,12±3,18 ^A (11,5–24,2)	7,71±0,31 ^A (7,24–8,36)	35,33±15,06 ^A (19,8–76,4)	26,56±7,71 ^A (17,6–54,7)	49,04±23,48 ^A (29,84–102,78)	91,53±9,11 ^A (78,7–110)
Piletas	22,06±4,81 ^B (12,2–29,5)	8,61±0,43 ^C (7,35–9,40)	248,1±344,78 ^B (1,05–887)	435,47±373 ^B (1,01–984)	1503,7±695,87 ^B (84,61–2535,36)	82,3±16,3 ^A (61,5–93,1)
A°V	18,33±2,92 ^A (12,8–23,5)	8,4±0,28 ^C (7,73–8,98)	83,77±17,05 ^C (40,6–9128,5)	55,38±10,93 ^C (29,7–67,6)	112,49±24,5 ^C (64,35–152,75)	92,3±11,04 ^A (78,2–112)
A°H	17,82±2,63 ^A (12,5–21,7)	8,33±0,25 ^C (7,74–8,58)	106,95±19,38 ^C (57,6–124)	72,24±12,66 ^D (40,10–85,3)	153,91±25,22 ^C (92,19–180,17)	73,4±9,54 ^B (56,9–83,9)

Con respecto al pH este parámetro mostro diferencias entre los sitios estudiados ($F_{4,100} = 11.18$; $p < 0.001$). Los arroyos que circulan por roca granítica, presentaron valores neutros de pH cercanos a 7; mientras que los arroyos que circulan por roca metamórfica no se diferenciaron entre ellos con valores superiores a 8,3 (Figura 14). En el ambiente artificial (Piletas) el valor de pH promedio fue de 8,61, similar a los arroyos del ambiente metamórfico (Figura 12).

El Oxígeno disuelto en agua fue registrado en todos los sitios a partir del año 2015. Se observaron diferencias significativas entre sitios ($H = 7.96$; $p = 0.018$). Los menores valores se registraron en el sitio A°H con valores cercanos a 70 %, mientras que en los otros sitios esta variable mostró valores superiores a 80 %. (Figura 14).

Los arroyos que circulan sobre ambiente metamórfico (A°V y A°H) presentaron valores de sólidos disueltos totales ($F_{4,100} = 13.5$; $p < 0.001$), salinidad ($F_{4,100} = 20.1$; $p < 0.001$) y conductividad ($F_{4,100} = 77.25$; $p < 0.001$) similares entre sí pero significativamente mayores comparados con el arroyo Cerros Negros (CNantes y CNmina) que circula por ambiente granítico. El sitio Piletas mostró una gran variabilidad en estos parámetros, con valores muy elevados.

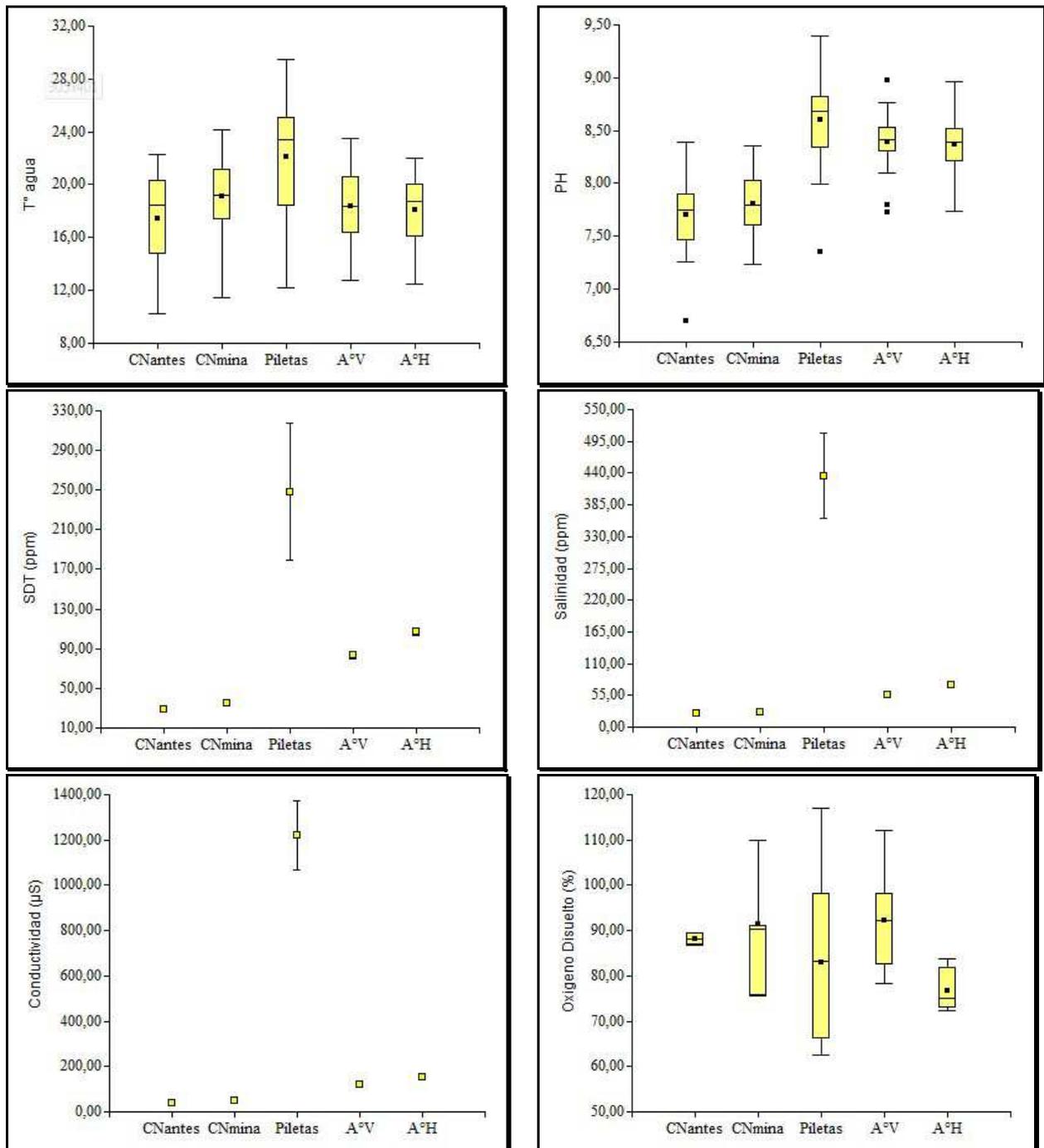


Figura 14. Diagramas de cajas. Se observan los valores medios (puntos negros dentro de la caja) y desvíos estándar de las principales variables Físico-Químicas en cada sitio de estudio.

En la Figura 15 se puede observar los registros de precipitaciones y temperaturas medias mensuales desde el 2014 al 2016 en la zona de muestreo. El año 2015 fue el más lluvioso de los tres considerados con una media anual de 1190 milímetros. De todos modos, como se ve en el grafico, los meses de verano son los que aportan mayor cantidad de milímetros, mientras que en Julio-Agosto no se registraron precipitaciones en ninguna de los años analizados. En cuanto a las temperaturas medias, los mayores valores superando los 20 °C se observaron entre Noviembre y Febrero; mientras que las temperaturas más bajas, cercanas a 5 °C promedio se observaron entre Junio y Agosto.

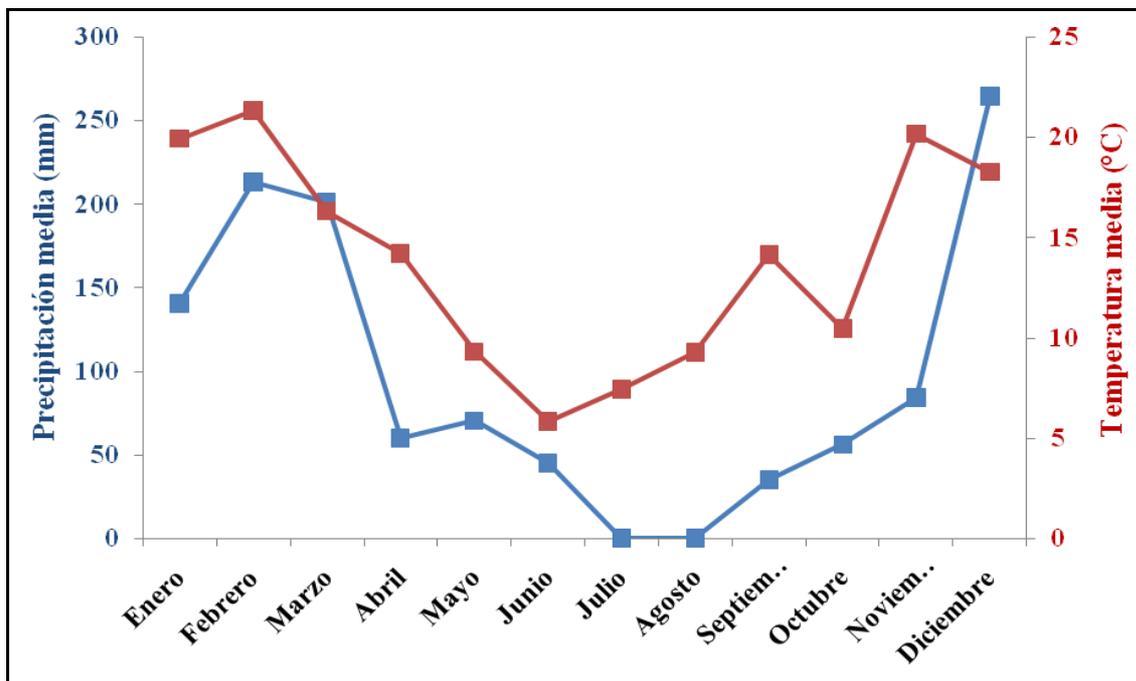


Figura 15. Medias mensuales de las variables meteorológicas, obtenidas de la estación instalada en la mina. Precipitaciones (Azul) y Temperatura (Rojo).

4.1.2.2. Análisis Físico-Químico del agua en laboratorio

Se realizó el análisis químico en laboratorio de cinco muestras de agua de cada sitio muestreado, menos en el A°H que solo se tomó una muestra por ser de características muy similares al sitio A°V (Tabla 3, Fig. 16).

En general, las muestras de arroyos sobre roca metamórfica (A°V y A°H) presentan concentraciones más elevadas en los iones HCO_3^- y SO_4^- con respecto a las localizadas en

ambiente granítico (CNantes y CNmina). Los cationes mayoritarios, Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} , también poseen concentraciones mayores en ambiente metamórfico.

El ión flúor en el sitio CNantes en un ambiente granítico, posee una concentración mayor, en promedio 1,23 mg/l, que los sitios (A°V y A°H) en ambientes metamórficos donde la concentración media fue 0,275 mg/l. Por otro lado, la concentración del ión F⁻ en el sitio CNmina fue en promedio 2,13 mg/l, resultando mayor que en el resto de los sitios.

Por último, es importante notar la gran concentración de iones que se registró en las Piletas con respecto al resto de los sitios (Fig. 10), donde se destacan el F⁻ (promedio= 11,8 mg/l) y principalmente el Arsénico ($\text{As}^{+3/+5}$ promedio= 7,35 $\mu\text{g/l}$).

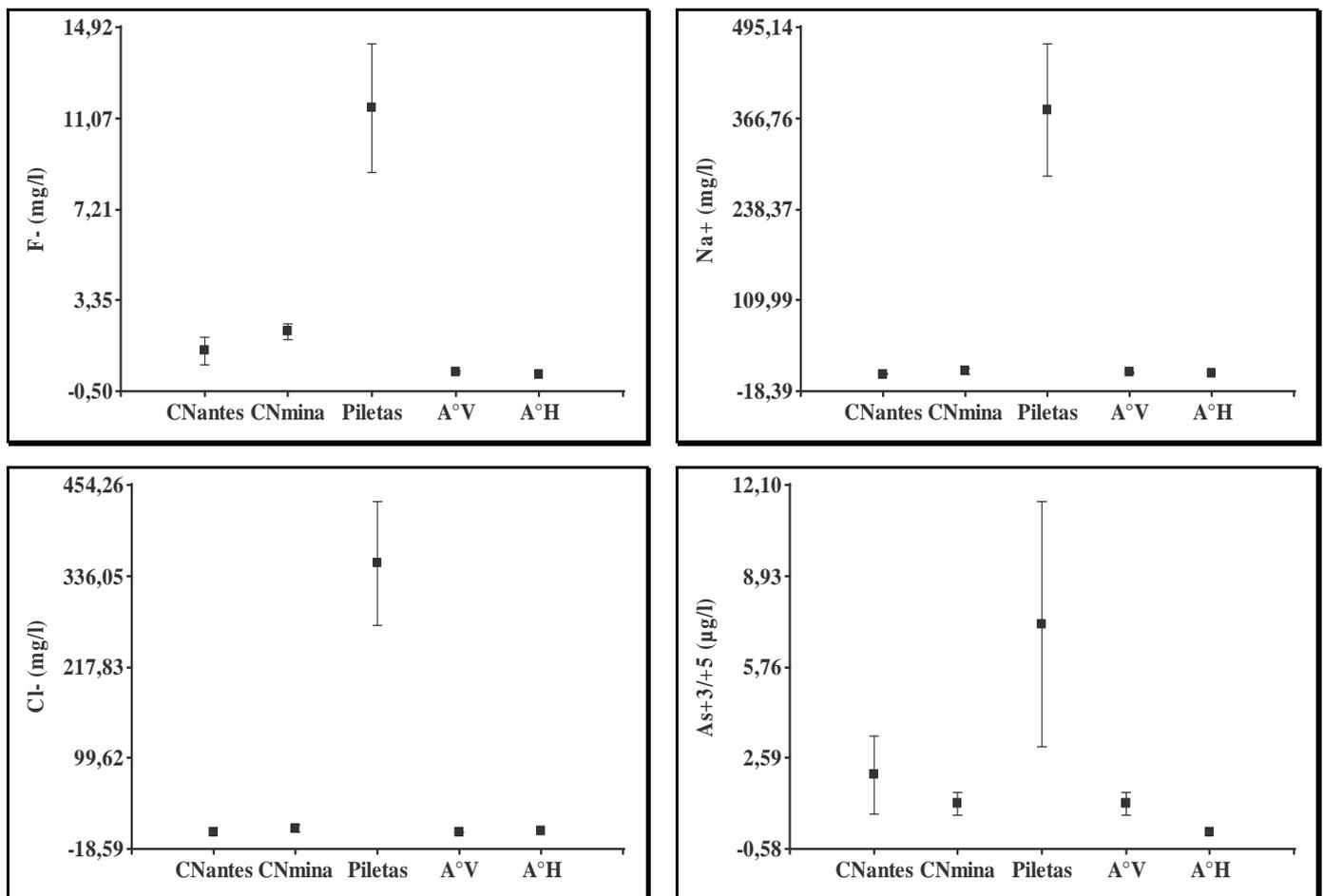


Figura 16. Diagrama de medias. Se observan los valores promedio (punto rojo) y desvíos estándar de la concentración de los principales iones en cada sitio de estudio.

Tabla 3. Análisis Químico del agua en laboratorio. Se muestra la media, el desvío estándar y rango de la concentración de iones en las muestras de agua de los diferentes sitios de estudio.

Sitio	HCO ₃ ⁻ mg/l	SO ₄ ⁻ mg/l	Cl ⁻ mg/l	Na ⁺ mg/l	K ⁺ mg/l	Ca ⁺⁺ mg/l	Mg ⁺⁺ mg/l	F ⁻ mg/l	As ^{+3/+5} µg/l
CN	20,6±6,8	8,2±1,72	2,9	5,63±1,3	0,3±0,14	3,6±1,1	1,73±0,9	1,23±1,2	2±2,7
antes	12-27,5	6,1-9,8		4,1-6,8	0,1-0,4	2,4-4,8	1-2,9	0,2-2,6	0,5-6
CN	38,7±29,5	14,3±12,2	7,95±9,7	9,75±8,3	0,53±0,41	8,2±6,3	2,45±1,5	2,13±0,6	1±0,82
mina	17,5-82,5	7,1-32,5	2,9-22,9	4,6-22,2	0,3-1,2	4-17,6	1-4,4	1,2-2,6	0,2-2
Piletas	302,5±170 169-545	112,4±30,1 80,7-150	352±161 214-542	378±187 226-608	11,2±4,1 8,1-17	22,2±7,6 17,6-33	6,73±2,1 4,9-8,8	11,8±5,34 4-16,8	7,35±8,5 2-19,5
A°V	77,8±9,5 65,3-85	23,2±4,7 16,3-26,7	3,25±0,7 2,9-4,3	7,93±0,9 6,6-8,9	0,75±0,26 0,4-1	15,8±2,9 12-19,2	5±1,9 2,4-6,8	0,33±0,1 0,21-0,5	1±0,85 0,1-2
A°H	107,5	22,4	4,3	7,6	1,0	22,4	6,8	0,2	0

Las determinaciones de la concentración de iones, permitieron obtener la clasificación geoquímica del agua utilizando el diagrama de Piper (Piper, 1953), los resultados se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación Geoquímica del agua según diagrama de Piper (1953).

Sitio	Por salinidad	Por dureza	Clasificación Geoquímica
CNantes	Dulce	Blanda	Bicarbonatada-Sulfatada; Sódico-Cálcica Bicarbonatada; Sódico-cálcica
CNmina	Dulce	Blanda Algo dura	Bicarbonatada; Sódico-Cálcica
Pileta	Dulce	Algo dura Dura	Clorurada-Bicarbonatada; Sódica Clorurada; Sódica
A°V	Dulce	Blanda Algo dura	Bicarbonatada; Cálcica Bicarbonatada; Cálcico-Magnésica
A°H	Dulce	Algo dura	Bicarbonatada-Cálcica

4.2. Ensamble de anfibios

Mediante las transectas acústicas y de encuentros visuales se registraron 315 individuos adultos de 8 especies pertenecientes a 4 familias de anfibios anuros (Tabla 5). La familia Hylidae es la de mayor porcentaje del total de capturas (47,3%) representada únicamente por la especie *Boana cordobae*, seguida por la familia Bufonidae (43,4%) representadas por las especies *Rhinella arenarum* (36,5%) y *Melanophryniscus stelzneri* (6,25%). Las familias Leptodactylidae (8,1%) y Odontophrynidae (0,9%) fueron las menos representadas en las muestras.

Tabla 5. Especies de anuros capturados en los sitios de muestreo. Taxonomía según Frost, (2018). Se muestra el número de individuos (Porcentaje del total capturado) de cada especie.

Familia <i>Especie</i>	Sitios					<i>Individuos por especie</i>
	CNantes	CNmina	Piletas	A°V	A°H	
Bufonidae						
<i>Rhinella arenarum</i>	-	35(74.5%)	50(49.5%)	27(33.3%)	3(4.3%)	115(36.5%)
<i>Melanophryniscus stelzneri</i>	-	-	-	9(11.1%)	13(18.8%)	22(6.9%)
Hylidae						
<i>Boana cordobae</i>	15(88.2%)	12(25.5%)	43(42.6%)	34(41.9%)	45(65.2%)	149(47.3%)
Leptodactylidae						
<i>Leptodactylus gracilis</i>	-	-	4(3.9%)	8(9.8%)	8(11.6%)	20(6.3%)
<i>Leptodactylus latinasus</i>	-	-	-	3(3.7%)	-	3(0.9%)
<i>Leptodactylus latrans</i>	2(11.8%)	-	-	-	-	2(0.6%)
<i>Leptodactylus mystacinus</i>	-	-	1(0.9%)	-	-	1(0.3%)
Odontophrynidae						
<i>Odontophrynus cordobae</i>	-	-	3(2.9%)	-	-	3(0.9%)
<i>Individuos por Sitio</i>	17(5.4%)	47(14.9%)	101(32.1%)	81(25.7%)	69(21.9%)	315(100%)

Los índices de riqueza, equitatividad y diversidad calculados según Magurran (1987) se muestran en la Tabla 6. La menor riqueza registrada (S=2) corresponde a los sitios CNantes y CNmina, ambos sitios localizados en ambientes graníticos. Por otro lado, las mayores riquezas de especies se registraron en las Piletas (S=5) y en los sitios localizados en ambientes metamórficos A°V (S=5) y A°H (S=4). Los índices de diversidad calculados (D y H) fueron muy variables entre los sitios de estudio, correspondiendo al

sitio CNantes la menor diversidad y al A°V la mayor diversidad, para ambos índices. CNmina y A°V mostraron la mayor equitatividad en la abundancia de especies ($E=0,8203$ y $E=0,7166$, respectivamente).

De acuerdo a los resultados del test-t de Hutchinson (Magurran, 1987) utilizado para comparar la diversidad entre los sitios de muestreo, se observa que CNantes posee la menor diversidad y se diferencia significativamente del resto de los sitios. Los sitios Piletas y A°H, no se diferenciaron entre sí en ninguno de los índices. Mientras que el A°V fue significativamente más diverso que el resto de los sitios.

Tabla 6. Índices de diversidad de los ensambles de anfibios en cada sitio de estudio.

Sitio	Riqueza (S)	Simpson (D)	Shannon (H)	Equitatividad (E)
CNantes	2	1,1421 ^A	0,2448 ^A	0,3532
CNmina	2	1,6148 ^B	0,5686 ^B	0,8203
Piletas	5	2,2169 ^C	0,9208 ^C	0,5721
A°V	5	2,6435 ^D	1,1533 ^D	0,7166
A°H	4	2,0230 ^C	0,9568 ^C	0,6901

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Hutchinson *t*-test, $P < 0,05$)

Las curvas de rarefacción (Fig. 17), realizadas con los índices Chao estimados por Estimates y el N° de muestreo realizados hasta el momento, muestra que el esfuerzo de muestreo necesario para estimar una correcta diversidad en cada sitio es muy variable. De igual modo las curvas de rarefacción de todos los sitios alcanzan la asíntota a partir del muestreo 15; lo cual nos indica que el número de muestreos realizados fueron suficientes para conocer la diversidad de especies reales en cada ensamble.

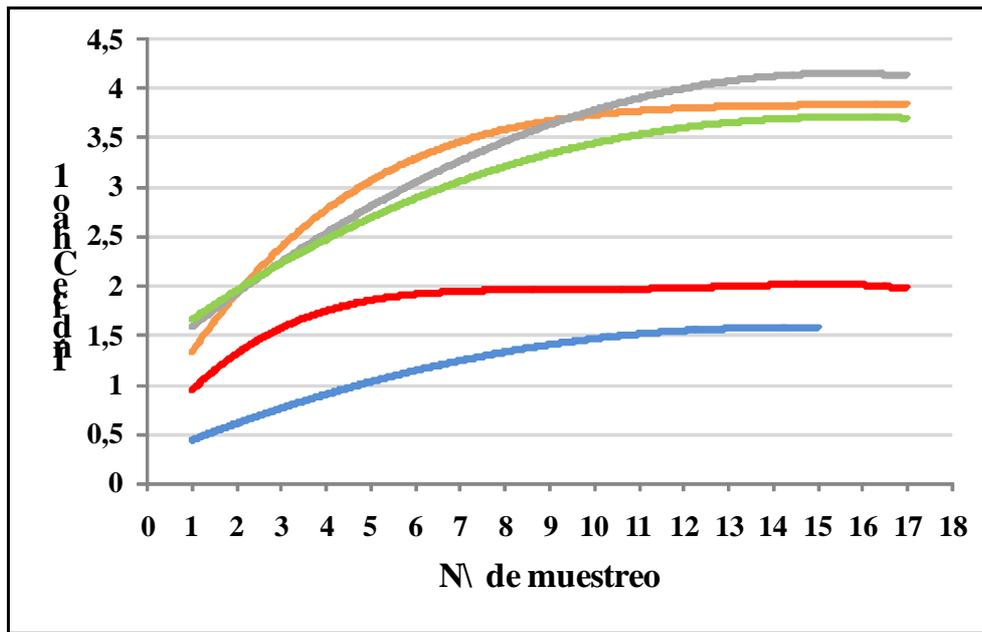


Figura 17. Curvas de rarefacción en las que se relaciona el Índice Chao y el N° de muestreos. CNantes (azul); CNmina (rojo); Piletas (verde); A°V (gris); A°H (naranja).

El número de individuos necesarios para estimar la riqueza de especies de cada sitio, resultó muy diferente entre sí (Fig. 18). En CNantes y CNmina se obtuvo la riqueza de especies con el menor número de individuos muestreados. Sin embargo, para estimar la riqueza real en A°V, A°H y Piletas, el número de muestras necesario superó los 60 individuos por sitio.

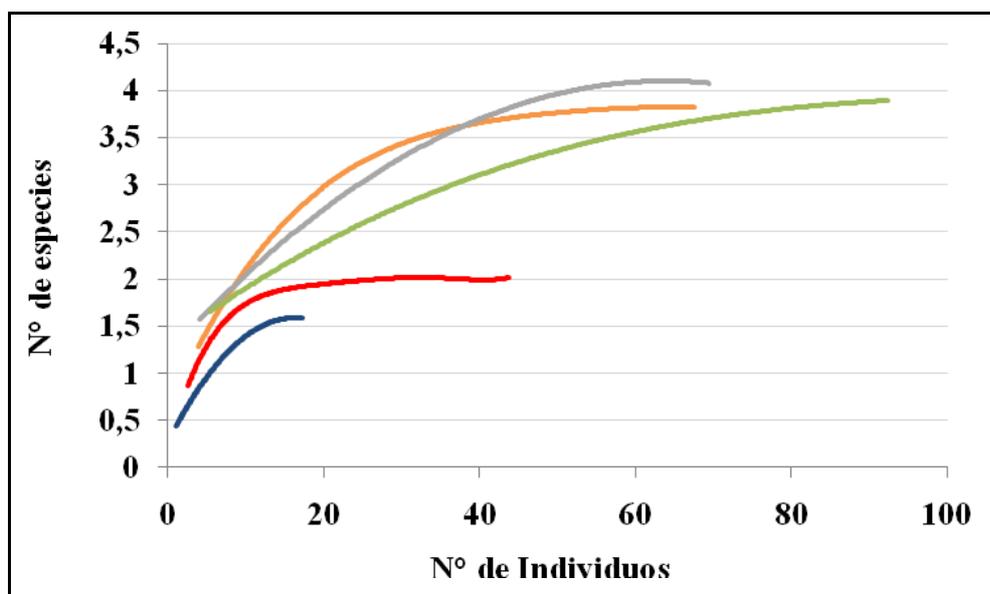


Figura 18. Acumulación de especies con respecto al número de individuos muestreados en cada sitio. CNantes (azul); CNmina (rojo); Piletas (verde); A°V (gris); A°H (naranja).

Se utilizaron los valores de los primeros 15 muestreos realizados ya que según la curva de rarefacción (Figura 17) son suficientes para una correcta estimación. Los índices de riqueza y diversidad, calculados por la metodología de rarefacción, mostraron diferencias significativas entre sitios y se muestran en la Tabla 7. La riqueza (S) mostró valores medios diferente entre sitios ($F_{70,4} = 34,76$; $P < 0,01$), de igual modo, los valores máximos estimados por este método son algo menores a los calculados con Magurran, (1987).

Los índices de diversidad (D y H) estimados luego de rarificar las muestras fueron diferentes entre sitios ($D = F_{70,4} = 200,46$; $P < 0,01$; $H = F_{70,4} = 126,98$; $P < 0,01$). Al igual que con el método de Magurran, (1987) el sitio que mostró los mayores índices de diversidad fue A°V, seguido por las Piletas y A°H. Los sitios menos diversos fueron CNmina y CNantes. Si bien la diversidad relativa entre sitios se mantuvo, luego de rarificar las muestras, los valores de índices estimados fueron algo menores (Tabla 7).

Tabla 7. Índices de riqueza y diversidad media (Rango) de los ensambles en cada sitio de estudio luego de realizar rarefacción con Estimates.

Sitio	Riqueza (S)	Simpson (D)	Shannon (H)
CNantes	1,21 (0,37-1,63) ^A	1,21 (1,11-1,28) ^A	0,2 (0,11-0,29) ^A
CNmina	1,83 (0,85-2) ^B	1,54 (1,41-1,61) ^B	0,49 (0,36-0,55) ^B
Piletas	3,1 (1,48-3,98) ^C	2,08 (1,71-2,18) ^C	0,81 (0,55-0,88) ^C
A°V	3,34 (1,25-4,22) ^C	2,39 (1,95-2,56) ^D	0,93 (0,62-1,06) ^D
A°H	3,23 (1,26-3,86) ^C	1,92 (1,7-2) ^E	0,81 (0,55-0,91) ^C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (ANOVAs, $P < 0,05$)

El análisis de correspondencia canónica (Fig. 19) muestra la relación entre las variables ambientales y la presencia de cada especie por sitio de estudio. El eje 1 (explica el 23,9 % de la variabilidad de los datos) muestra principalmente la relación inversa entre la presencia de *L. latrans* y *B. cordobae* con el pH y la concentración de Ca^{++} , Mg^{++} . Por otro lado, el eje 2 (Explica el 76,1 % de la variabilidad de los datos) muestra una asociación inversa entre especies de piel sensible (*L. latinasus*, *L. gracilis*, *L. latrans*, *M. stelzneri* y *B. cordobae*) y las altas concentraciones de Cl^- , F^- , As . Mientras que *R.*

arenarum y *O. cordobae* se asocia positivamente a estas. Cabe aclarar que la cobertura vegetal registrada fue muy variable entre sitios (CNantes-50%; CNmina-30%; Piletas-15%; A°V-65% y A°H-85%) y que se asocia fuertemente a la presencia de *M. stelzneri*, *L. latinasus* y *L. gracilis* en los sitios A°V y A°H.

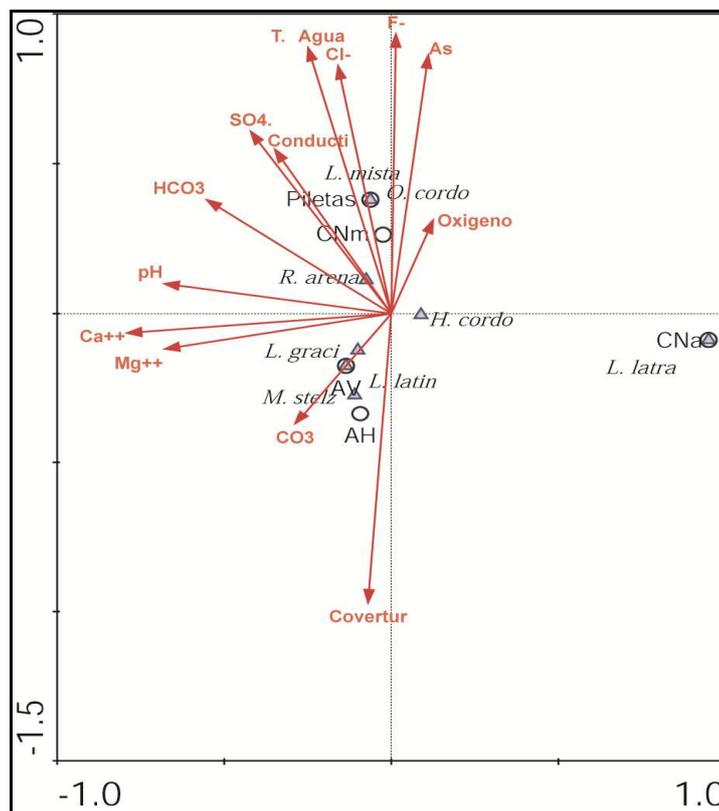


Figura 19. Análisis de correspondencia canónica. Relación entre variables ambientales (Flechas rojas), especies registradas (triángulos grises) y sitios estudiados (círculos negros).

4.3. Crecimiento y desarrollo larval de *Rhinella arenarum*

4.3.1. Experiencia en microcosmos

Análisis de las características Físico-Químicas del agua procedente de cada sitio de estudio utilizadas en los microcosmos (Tabla 8). La temperatura del agua se mantuvo relativamente constante durante la experiencia y no mostró diferencias entre sitios (ANOVA; $F_{3,71}=0,04$; $P=0,988$). El Ph del sitio Piletas fue el más alcalino, mientras que los sitios CNantes y CNmina arrojaron valores cercanos a la neutralidad ($F_{3,71}=18,89$; $P<0,01$). La salinidad y conductividad son parámetros relacionados; estos mostraron valores muy distintos entre sitios (Sal.= $F_{3,71}=21,88$; $P<0,01$; Cond.= $F_{3,71}=33,61$; $P<0,01$), siendo mayores en las Piletas y menores en CNantes. Los iones analizados que se muestran en la tabla 8 presentaron concentraciones diferentes entre sitios, con valores muy elevados en las Piletas.

Tabla 8. Valores medios, Desvio Estándar, Máximo y Mínimo de las variables físico-químicas en cada pecera.

Variables	CNantes	CNmina	Piletas	A°V
Transparencia del agua	alta	media	baja	alta
T agua °C	23,79 ± 0,95 ^A (22 – 25,3)	23,78 ± 0,97 ^A (22 – 25,3)	23,81 ± 0,95 ^A (22 – 25,4)	23,88 ± 0,96 ^A (22,1 – 25,5)
Ph	7,58 ± 0,3 ^A (7,33 – 8,32)	7,64 ± 0,28 ^A (7,28 – 8,21)	8,39 ± 0,31 ^B (7,84 – 8,83)	8,13 ± 0,32 ^C (7,6 – 8,8)
Conductividad µS	105,6 ± 55,5 ^A (39,5 – 204)	136 ± 84,11 ^A (53,8 – 317)	1591,6 ± 314,1 ^B (1097 – 1910)	191 ± 50,42 ^A (111,2 – 295)
Salinidad (ppm)	54,27 ± 24,88 ^A (25,1 – 104)	68,64 ± 38,89 ^A (31,2 – 153)	797,5 ± 162,91 ^B (542 – 987)	92,27 ± 24,48 ^A (56,5 – 143)
SO₄⁼ (mg/l)	8,1	9,4	123,4	26,7
Cl⁻ (mg/l)	2,9	7,95	542,9	3,25
Na⁺ (mg/l)	5,5	6,7	618,8	8,2
F⁻ (mg/l)	1,8	2,6	16,8	0,3

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P>0,05$); DGC post hoc test.

La experiencia con microcosmos tuvo una duración de 61 días. Su finalización se debió a que en el sitio Piletas no quedaban sobrevivientes, además de que en el resto de los sitios se produjo la metamorfosis de varios individuos. En la Tabla 9 se resume la cantidad de individuos totales con los que finalizó la experiencia.

Tabla 9. N° de larvas utilizados y condición en la que llegaron al final de la experiencia.

Sitio	N° de larvas al inicio	Larvas extraídas durante el ensayo	N° de metamorfo.	N° de Sobrevivientes	N° de muertos durante el ensayo
CNantes	(50 x 3 replicas) 150	50	15	54	31
CNmina	(50 x 3 replicas) 150	50	13	43	44
Piletas	(50 x 3 replicas) 150	50	3	5	92
A°V	(50 x 3 replicas) 150	50	18	53	29

Crecimiento, desarrollo y mortalidad

Las muestras extraídas en el transcurso del ensayo y las medidas tomadas en las larvas se muestran en la figura 20. No se observaron diferencias significativas entre sitios respecto al estadio (Gosner, 1960) en el transcurso del ensayo ($F_{140,3}= 0,77$; $P=0,512$). Por otro lado, el largo total (LT) no mostro diferencias entre sitios si analizamos toda la experiencia en conjunto, pero si se observaron diferencias significativas en algunos rangos de días (rango 36-40: $F_{20,3}=3,35$, $P<0,05$. rango 44-50: $F_{20,3}=2,73$, $P<0,05$). En cuanto al ancho del cuerpo de las larvas, las diferencias entre sitios comenzaron a hacerse significativas a partir del día 36 en adelante. El peso de las larvas fue diferente entre sitios a partir del día 36, con valores bajos en las Piletas y altos en el A°V. La condición corporal de las larvas no fue significativamente diferente, ya que mostró patrones variables en los sitios en el transcurso de los días, sin una tendencia definida. El alto del músculo de la cola, que se relaciona con la capacidad natatoria de las larvas, mostró diferencias significativas entre sitios (rango 36-40: $F_{20,3}=4,96$, $P<0,01$. rango 57-61: $F_{20,3}=2,88$, $P<0,05$), siendo menor en las Piletas.

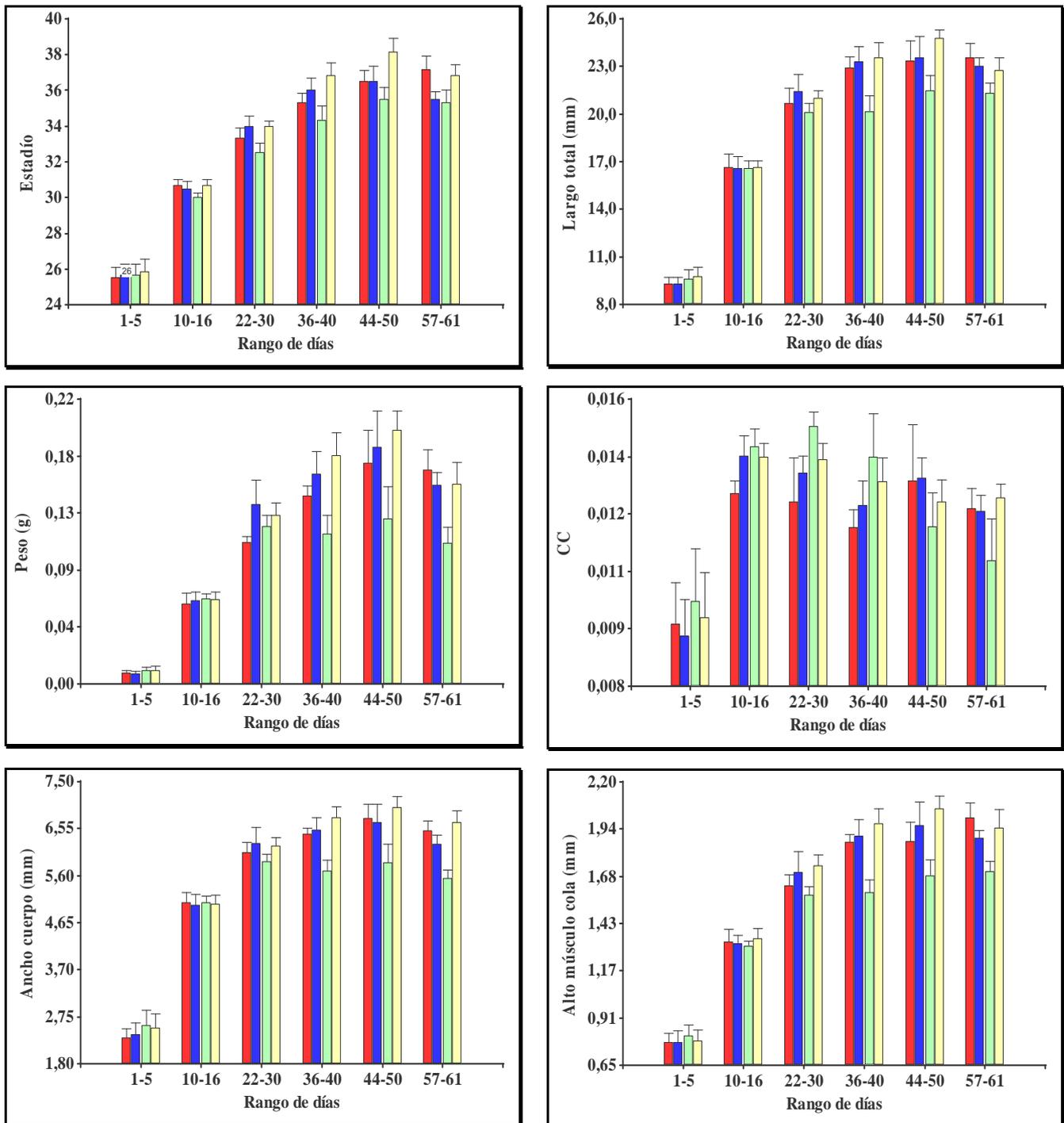


Figura 20. Gráficos de barra. Se muestran variables morfométricas medidas en larvas con respecto al transcurso de los días del ensayo. CNantes (rojo), CNmina (azul), Piletas (verde) y A°V (amarillo).

Las Regresiones lineales (Fig. 21) entre el Largo total (mm) y el Peso (g) de las larvas en el transcurso del ensayo fueron significativas y mostraron un patrón similar para todos los sitios (CNantes: $R^2=0,87$; $F=224$; $P<0,01$; CNmina: $R^2=0,92$; $F=372$; $P<0,01$; Piletas: $R^2=0,84$; $F=180$; $P<0,01$; A°V: $R^2=0,93$; $F=439$; $P<0,01$) en el que a medida que

aumenta Largo total también lo hace el peso. La proporción de variación explicada (R^2) por los modelos fue elevada para todos los sitios, destacándose los sitios CNmina y A°V.

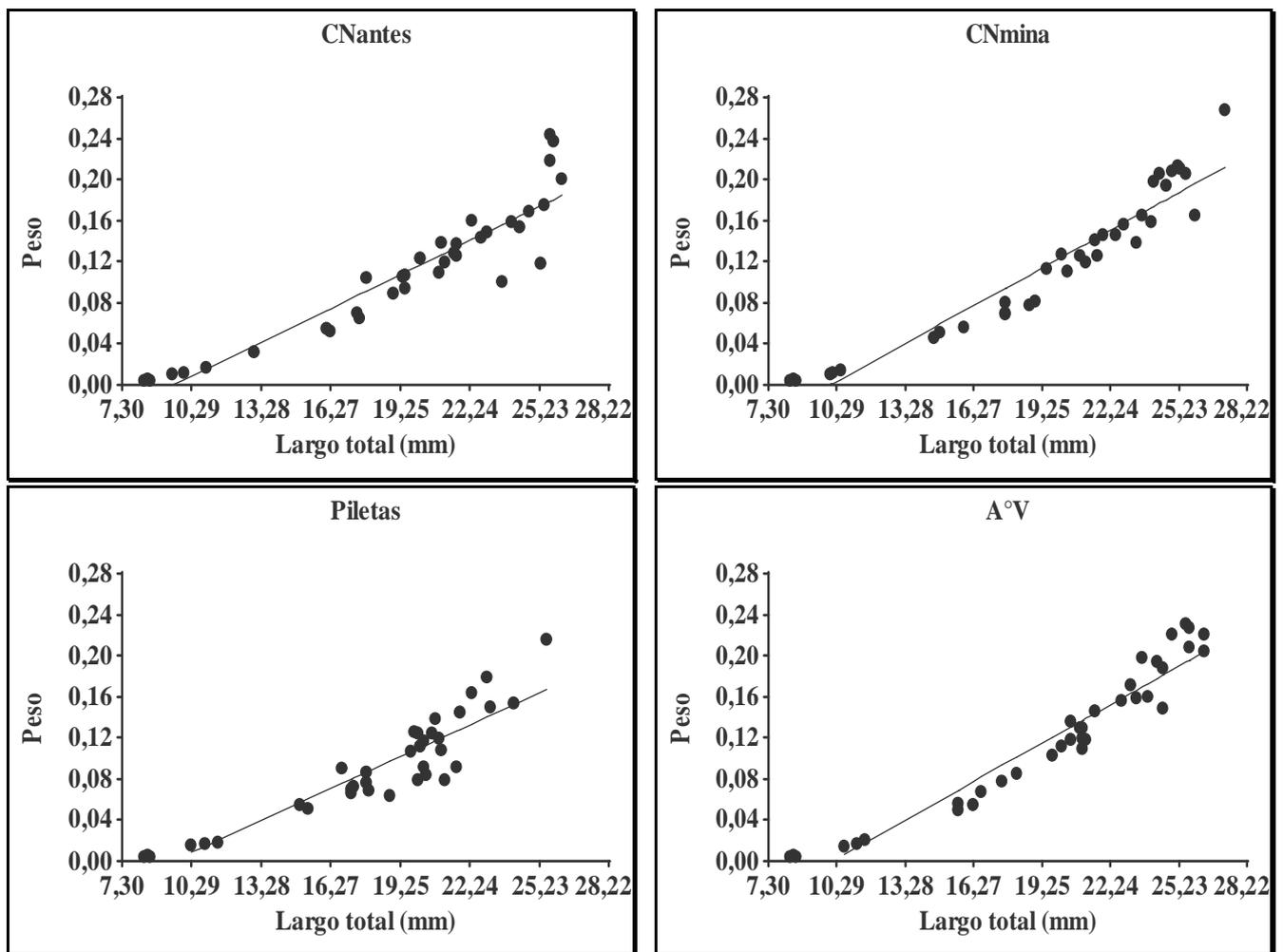


Figura 21. Regresiones lineales entre el Peso y largo total de larvas del ensayo (microcosmo) para cada sitio de estudio.

El mayor porcentaje de muertes entre larvas expuestas a diferentes tratamientos se dio en los estadios 32–34 (Gosner, 1960). Este nivel de desarrollo se alcanzó entre los 25–35 días de iniciado el experimento y el porcentaje de muertes observado fue diferente entre sitios CNantes= 16%; CNmina= 20,6%; Piletas= 46,6% y A°V= 12%. Al finalizar la experiencia el porcentaje de muertes fue en aumento manteniendo una tendencia similar (CNantes= 20,6%; CNmina= 29,3%; Piletas= 61,3% y A°V= 19,3%), en la que se observó mayor mortalidad de larvas en las Piletas (Fig. 22).

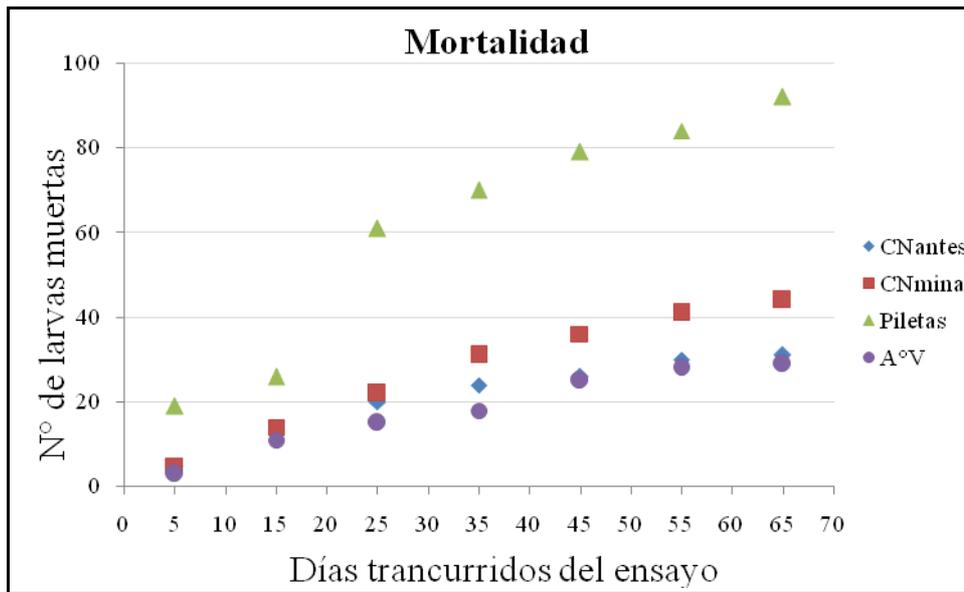


Figura 22. Gráfico de puntos. Se observan el número acumulado de larvas muertas en el transcurso del ensayo (microcosmos) para cada sitio de estudio.

4.3.1.1. Índices de crecimiento y desarrollo larval

Utilizando el largo total (LT) para el cálculo de las tasas de crecimiento, se observó un acelerado aumento de dicha tasa hasta 16-20 días de iniciada la experiencia, principalmente de larvas de Piletas y A°V y luego un continuo descenso hasta finalizar el ensayo (Fig. 23). Considerando las tasas de crecimiento (LT) promedio al finalizar el ensayo, no se obtuvieron diferencias significativas entre sitios (ANOVA, $F= 1,32$; $P= 0,296$) (Tabla 10). Cuando se tuvo en cuenta el peso de las larvas, las tasas de crecimiento mostraron un comportamiento similar a las tasas de crecimiento (LT) con un acelerado aumento de hasta los 16-20 días (principalmente en las Piletas y A°V) y luego un continuo descenso (Fig. 23). Pero cuando se compararon las tasas de crecimiento (peso) promedios al finalizar el ensayo se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento entre sitios (ANOVA, $F= 4,33$; $P<0,05$); siendo significativamente menor (DGC; test $P<0,01$) en el sitio Piletas (Tabla 10).

Las tasas de desarrollo tuvieron un comportamiento similar entre sitios, aunque se observa un desarrollo superior de las larvas del A°V en todos los días analizados. Los tratamientos mostraron diferencias en la tasa de desarrollo de las larvas media al finalizar la experiencia (ANOVA, $F=3,28$; $P<0,05$). El desarrollo de las larvas fue significativamente menor en las Piletas (DGC; test $P<0,01$) (Tabla 10).

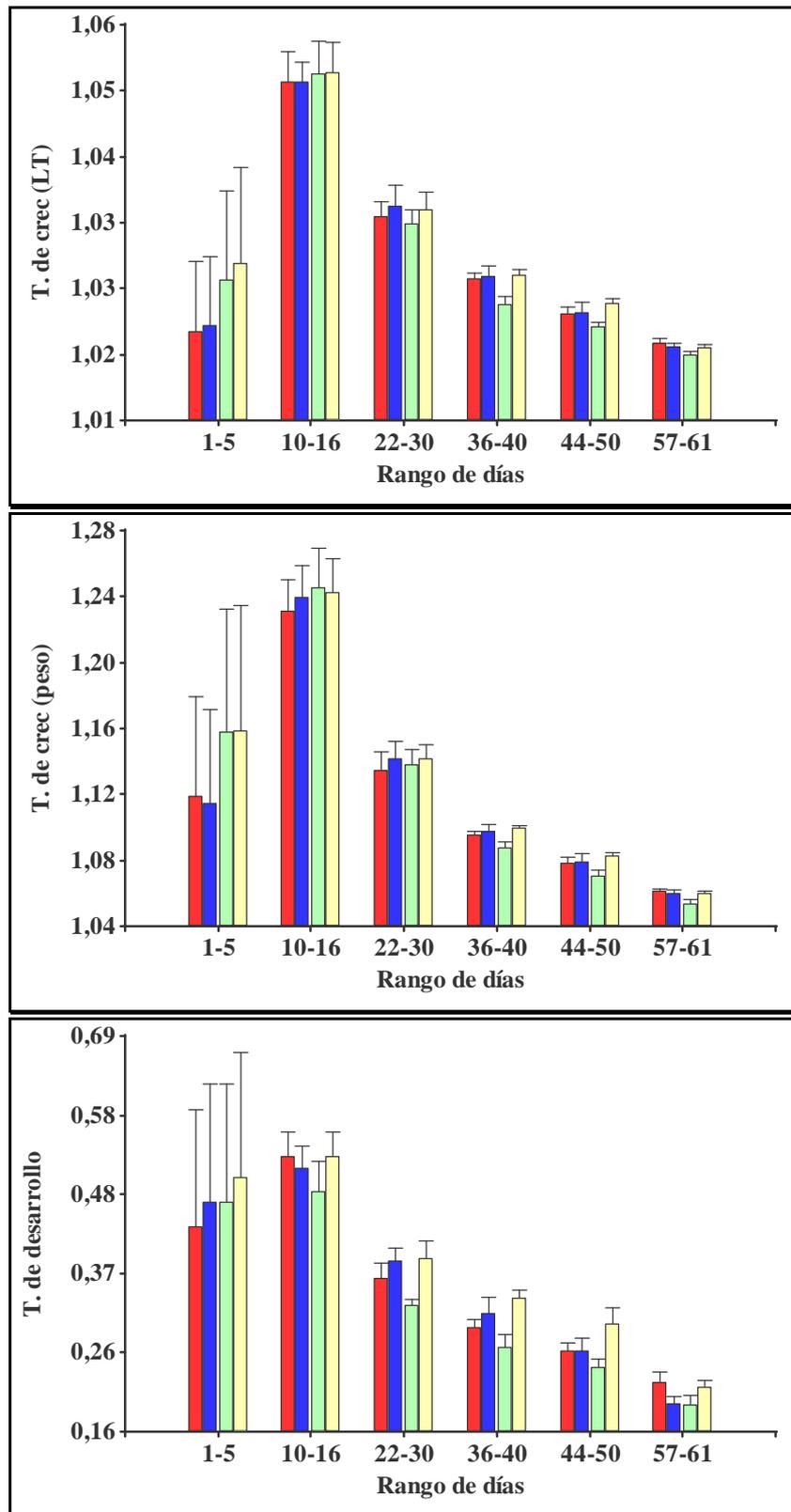


Figura 23. Gráficos de barra. Tasas de crecimiento y desarrollo larval con respecto al transcurso de los días del ensayo. CNantes (rojo), CNmina (azul), Piletas (verde) y A°V (amarillo).

Tabla 10. Tasas de crecimiento y de desarrollo de las larvas al finalizar el experimento.

Sitio	Tasa de crecimiento (Peso)	Tasa de crecimiento (LT)	Tasa de desarrollo
CNantes	$1,064 \pm 0,005^A$ (1,059 – 1,071)	$1,0099 \pm 0,0026^A$ (1,0071 – 1,0142)	$0,207 \pm 0,033^A$ (0,180 – 0,263)
CNmina	$1,063 \pm 0,002^A$ (1,060 – 1,066)	$1,0098 \pm 0,0020^A$ (1,0071 – 1,0129)	$0,181 \pm 0,018^{AB}$ (0,164 – 0,211)
Piletas	$1,056 \pm 0,005^B$ (1,050 – 1,064)	$1,0075 \pm 0,0039^A$ (1,0032 – 1,0124)	$0,167 \pm 0,021^B$ (0,131 – 0,193)
A°V	$1,063 \pm 0,004^A$ (1,054 – 1,067)	$1,0103 \pm 0,0018^A$ (1,0083 – 1,0132)	$0,201 \pm 0,023^A$ (0,175 – 0,230)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

4.3.1.2. Metamorfoseados

Los primeros metamorfoseados se observaron en los arroyos (CNantes, CNmina, A°V) entre los 25-35 días de iniciado el ensayo. Mientras que para el sitio Piletas el primer metamorfoseado se obtuvo a los 55 días. Los tres arroyos estudiados tuvieron un comportamiento similar en cuanto a la metamorfosis de larvas (Fig. 24), aunque en A°V se obtuvo el mayor número de metamorfos. En las piletas solo se obtuvieron 3 metamorfoseados al final de la experiencia.

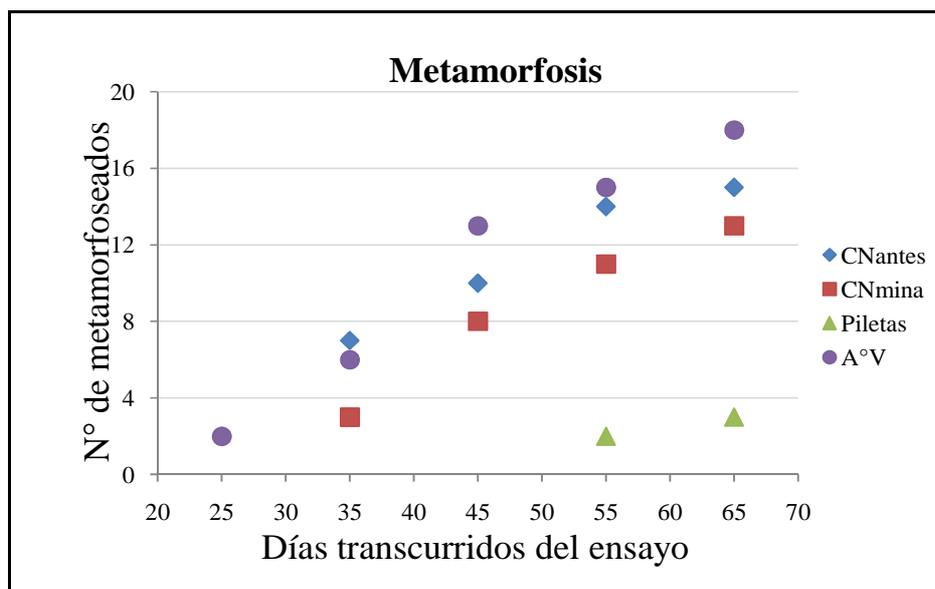


Figura 24. Gráfico de puntos. Número acumulado de individuos metamorfoseados en el transcurso del ensayo (microcosmos) para cada sitio

Se observó una alta correlación entre Log-Peso y Log-LHC en los individuos recién metamorfoseados de todos los sitios (CNantes: (r=0,92; P<0,01); CNmina: (r=0,9; P<0,01); A°V: (r=0,86; P<0,01).

No se obtuvieron diferencias significativas en el LHC y Peso entre los diferentes sitios (T= 1,05; P=0,364). Mientras que cuando se comparó la condición corporal se encontraron diferencias significativas entre los sitios CNmina – A°V (T= 2,29; P<0,05). El sitio Piletas no pudo ser incluido en los análisis estadísticos ya que se obtuvieron solo tres metamorfoseado; aunque en la Tabla 11 vemos que posee valores muy bajos de LHC, Peso y CC.

Tabla 11. Variables medidas en los individuos metamorfoseados en los diferentes tratamientos.

Sitio	N° de metamorfos	Días a la metamorfosis	LHC (mm) a la metamorfosis	Peso (g) a la metamorfosis	CC a la metamorfosis
CNantes	15	46,33 ± 4,82 ^A	8,86 ± 0,76 ^A	0,072 ± 0,024 ^A	0,100 ± 0,011 ^{AB}
CNmina	13	48,43 ± 5,35 ^A	9,32 ± 0,78 ^A	0,080 ± 0,017 ^A	0,098 ± 0,010 ^A
Piletas	3	55,33 ± 5,6 ^B	8,33 ± 0,82 ^B	0,056 ± 0,030 ^B	0,095 ± 0,010 ^C
A°V	18	46,83 ± 4,74 ^A	9,14 ± 0,57 ^A	0,083 ± 0,016 ^A	0,108 ± 0,009 ^B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (P>0,05).

4.3.2. Experiencia en jaulas *IN SITU*

La experiencia se llevo a cabo en solo dos de los sitios propuestos debido a a las características impredecibles de los arroyos y a problemas de logística. En la Tabla 12 se muestra el análisis Físico-Químico del agua de las Piletas y de A°V en la experiencia realizada *IN SITU*.

Tabla 12. Valores medios, Desvio Estándar, Máximo y Mínimo de las variables físico-químicas en cada sitio.

Sitio	T. agua (°C)	pH	Salinidad (ppm)	Conductividad (µS)	SO ₄ ⁼ (mg/l)	Cl ⁻ (mg/l)	Na ⁺ (mg/l)	F ⁻ (mg/l)	As ^{+3/+5} (µg/l)
Piletas	25,02±3,84 (20,5-29,5)	8,85±0,17 (8,74-9,15)	597,8±267 (184-862)	1402±285,9 (1067-1775)	123,4	542,9	618,8	13,5	4
A°V	20,58±2 (17,6-23,1)	8,41±0,13 (8,3-8,64)	61,42±5,83 (52,5-66,5)	122,9±13,13 (100,2-133,8)	26,7	2,9	8,2	0,3	1

La experiencia se extendió por 54 días y durante ese intervalo se obtuvieron 7 muestras de las jaulas en cada sitio. En la Figura 25 se observa un mayor desarrollo en estadios, Peso y Largo total de las larvas extraídas del sitio A°V, mientras que cuando analizamos la condición corporal es de notar la gran variación de dicho parámetro entre los días sucesivos de muestreo.

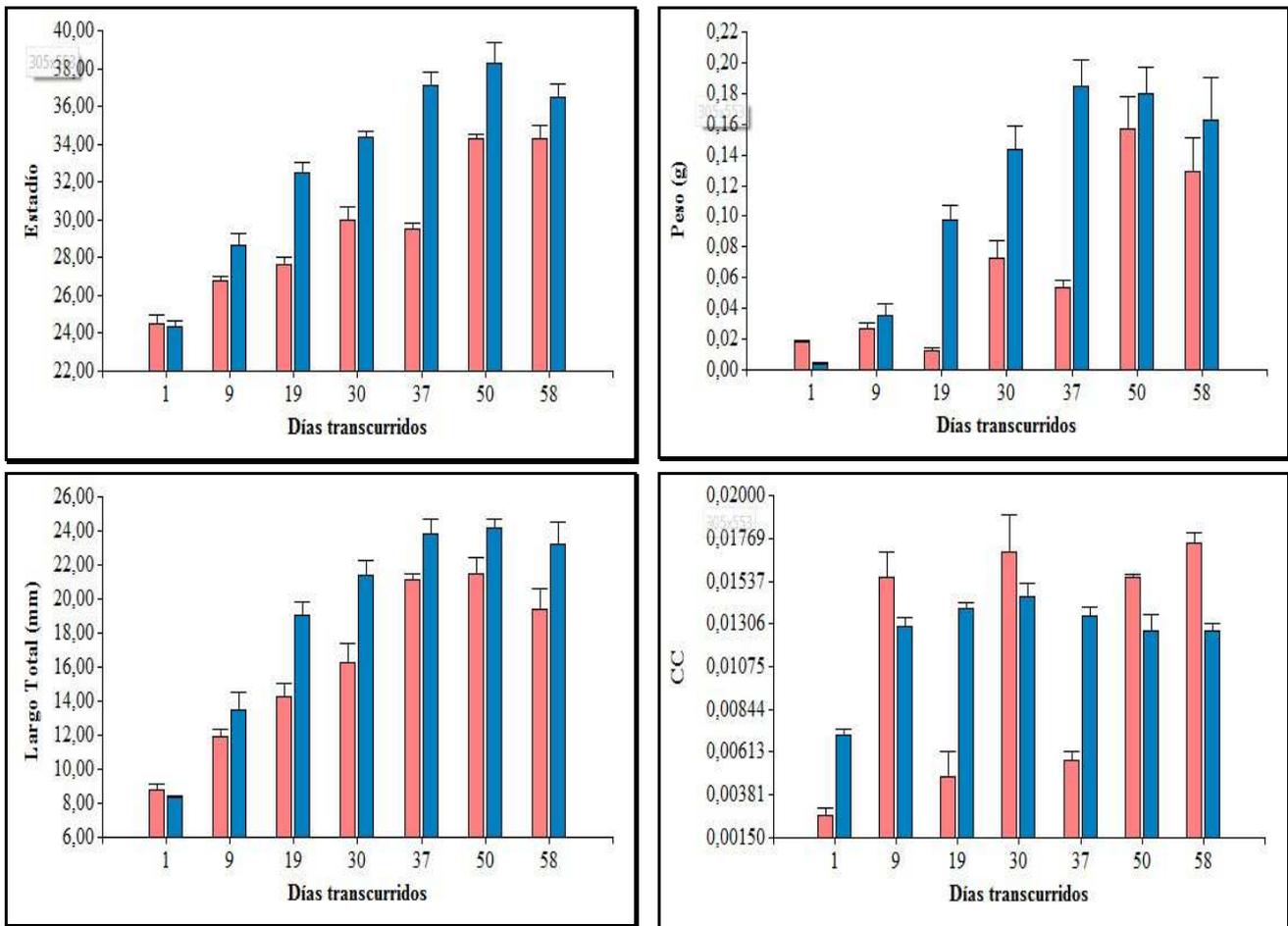


Figura 25. Gráfico de barras. Se muestran los valores medios de las variables morfofométricas medidas en las muestras extraídas de las jaulas de exclusión con el transcurso de los días. Piletas (Rojo); A°V (Azul).

Las tasas de crecimiento cuando se utilizó la condición corporal no fue diferente entre sitios (K-W; $H=2,08$; $P=0,22$), mientras que cuando se utilizó el peso de los individuos el sitio A°V mostro un valor significativamente mayor (K-W; $H= 3,61$; $P<0,05$) que en las Piletas (Tabla 13). En cuanto a la tasa de desarrollo también fue significativamente mayor en A°V (K-W; $H=5,33$; $P<0,05$).

Tabla 13. Tasas de crecimiento y de desarrollo promedio de las larvas extraídos de las jaulas de exclusión.

Sitio	Tasa de crecimiento (Peso)	Tasa de crecimiento (CC)	Tasa de desarrollo
Piletas	0,969 ± 0,0025 ^B (0,966 – 0,9715)	0,909 ± 0,0068 ^A (0,899 – 0,913)	0,146 ± 0,022 ^B (0,120 - 0,172)
A°V	0,972 ± 0,0026 ^A (0,967 – 0,974)	0,914 ± 0,0034 ^A (0,91 – 0,918)	0,254 ± 0,022 ^A (0,228 – 0,28)

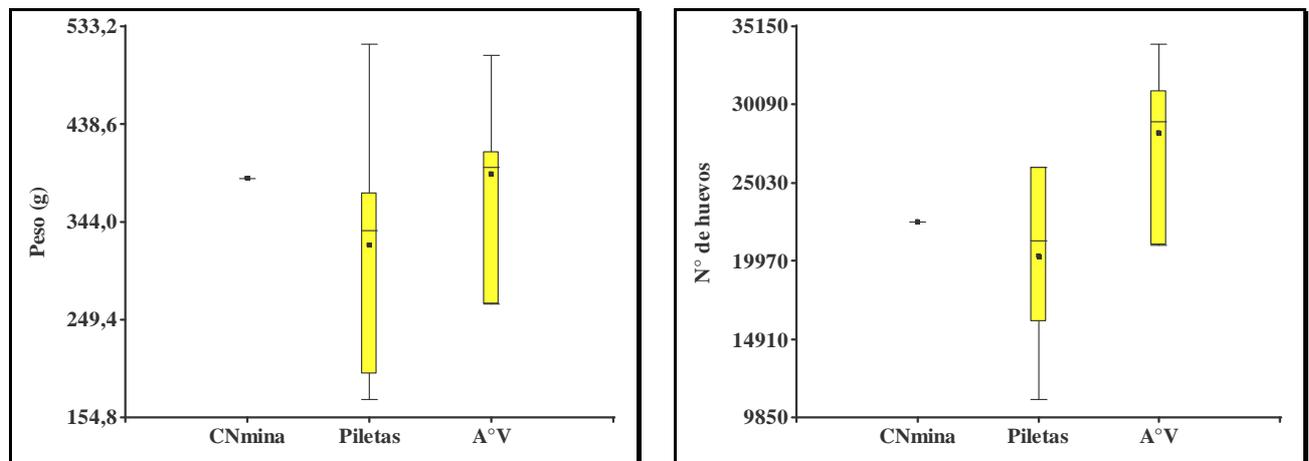
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P>0,05$).

4.3.3. Esfuerzo reproductivo

Durante el recorrido de los sitios se contaron 11 puestas en total de *R. arenarum* en los sitios CNmina, Piletas y A°V (Tabla 14). El peso total medio de las puestas no fue significativamente diferente entre sitios, aunque en la Figura 26 se observa una mayor dispersión de los datos en el sitio Piletas con una tendencia a ser más livianos que las puestas de A°V. El número de huevos promedio estimados por puesta fue mayor en el A°V que en los sitios CNmina y Piletas.

Tabla 14. Puestas registradas y características de las mismas en los sitios de estudio.

Sitio	Fecha	N° Puestas	Peso total (g)	N° Huevos totales
CNmina		1	385,5 ^A	22,500 ^A
Piletas	09/15-10/15	6	354,5±194,9 ^A	20,417±6230 ^A
A°V		4	390,5±99,4 ^A	28,250±5620 ^B

**Figura 26.** Diagramas de cajas. Se observan los valores medios (puntos negros dentro de la caja) y desvíos estándar del peso total de las puestas y n° de huevos por sitio.

4.4. Morfometría y demografía de poblaciones adultas

4.4.1. *Rhinella arenarum*

4.4.1.1. Variables morfométricas en adultos

La especie *R. arenarum* solo se registro para 3 de los sitios propuestos, durante dos temporadas de muestreo, siendo el sitio Piletas donde se capturaron mayor cantidad de individuos (n: 50; 8 hembra y 42 machos), mientras que en CNmina (n: 35; 14 hembras y 21 machos) y en A° Los Vallecitos la captura de individuos fue menor (n: 27; 17 hembras y 10 machos). Durante este tiempo de muestreo se han recapturado 3 individuos en el A° CNmina, 2 en A° Vallecitos y 3 en las Piletas. Todos los recapturados pertenecían al sitio de origen. En la totalidad de los casos los individuos fueron pesados, medidos y se realizó el corte de falange con el marcado correspondiente.

El tamaño (LHC) de los machos entre los diferentes sitios no mostró diferencias significativas (K-W, H=4,13; P=0,12). Cuando se analizó el Peso de las individuos adultos entre los sitios de estudio, encontramos diferencias significativas entre sitios ($F_{2,63}= 8,89$, $P<0,001$), correspondiendo a los individuos de CNmina los más livianos y los individuos procedentes de las Piletas los de mayor peso. Del mismo modo, la condición corporal fue estadísticamente diferente (K-W, H=9,13, $P<0,01$), siendo los individuos procedentes del A°V los de mayor condición corporal (Tabla 15). Las Hembras no mostraron diferencias entre los sitios para ninguna de las variables morfométricas medidas (LHC: $F_{2,35}=0,92$, $P=0,41$; Peso: $F_{2,35}=0,61$, $P=0,55$ y CC: $F_{2,35}=1,48$, $P=0,24$).

Tabla 15. Valores medios de largo hocico-cloaca (LHC), Peso y condición corporal (CC) por sexo.

Sitio	Machos			Hembras		
	LHC (mm)	Peso (g)	CC	LHC (mm)	Peso (g)	CC
CNmina	88,62 ± 8,63 ^A (74,4 - 105,3)	74,12 ± 11,5 ^A (48,5 - 90)	0,113 ± 0,33 ^A (0,076 - 0,18)	94,04 ± 6,23 ^A (85,78 - 106,8)	91,25 ± 20,6 ^A (57,9 - 119)	0,101 ± 0,016 ^A (0,087 - 0,137)
Piletas	93,34 ± 5,8 ^A (78,83 - 104,1)	97,84 ± 16,3 ^B (78 - 132,6)	0,122 ± 0,027 ^A (0,088 - 0,186)	101,2 ± 3,4 ^A (96 - 109,6)	108,4 ± 13,1 ^A (93 - 122,8)	0,099 ± 0,013 ^A (0,081 - 0,115)
A°V	89,6 ± 14 ^A (62,1 - 102,3)	85,2 ± 14,9 ^C (60,8 - 101,9)	0,145 ± 0,45 ^B (0,098 - 0,204)	95,43 ± 13,6 ^A (60,1 - 117,3)	89,49 ± 30,9 ^A (42 - 144,5)	0,105 ± 0,032 ^A (0,065 - 0,166)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P>0,05$)

4.4.1.2. Demografía Poblacional en *R. arenarum*

En todos los individuos estudiados mediante la técnica de esqueletocronología se pudieron observar líneas de detención de crecimiento (LAG) bien definidas en el periostio, que permitió determinar la edad en años que poseen (Fig.27).

La reabsorción endostial estuvo presente en algunos individuos de los diferentes sitios (CNmina: 28,5%; Piletas: 40% y A°V: 37,5%) pero en ningún caso obstaculizó la determinación de la edad debido a que la primer LAG nunca fue completamente reabsorbida. En algunos casos, las LAGs más exteriores se encontraron muy juntas y cerca del borde del periostio, pero en sitio de inserción de ligamento se pudo observar y contabilizar las líneas para determinar la edad correctamente.

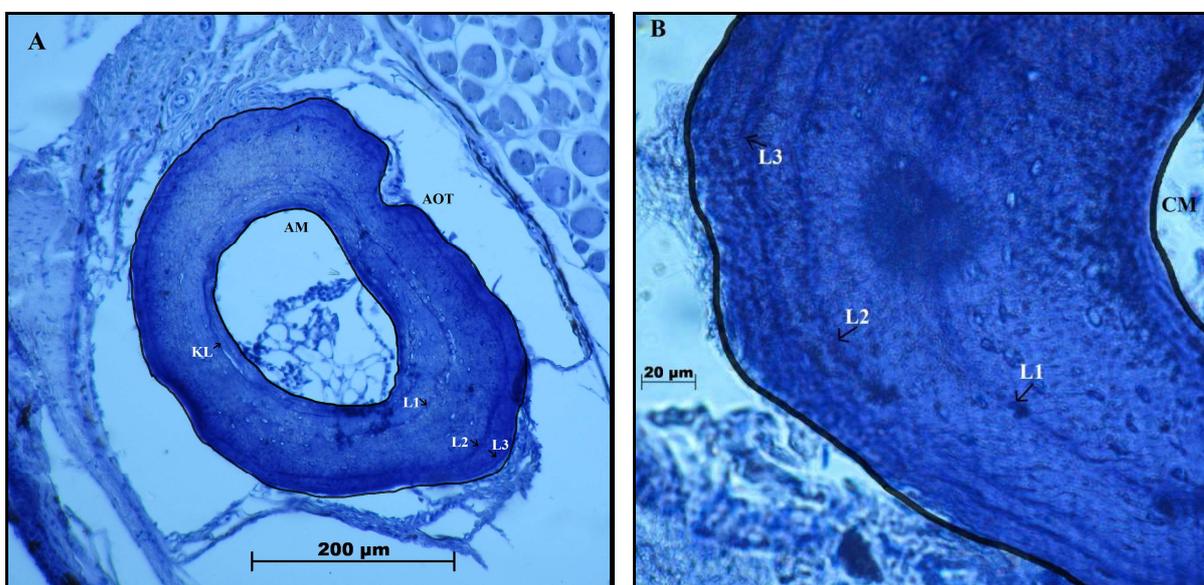


Figura 27. A) Hembra de *R. arenarum* A°V (10x). AM: Área Medular. AOT: Área Ósea Total. KL: Kastchenko Line (Línea entre endosteo y periosteo) L: LAGs (Línea de detención de crecimiento).– B) Hembra de *R. arenarum* CNmina (40x). CM: Cavidad Medular. Flechas indican las 3 LAGs que se observan en el corte. Foto: Manuel A. Otero

La comparación entre sitios mostró que no hay diferencias en la edad promedio entre las hembras (K-W, H=0,79; P=0,64) ni entre los machos (K-W, H=1,67; P=0,36) (Tabla 16).

Tabla 16. Edad (años) de los individuos adultos discriminados por sitio y sexo.

Sitio	Parámetro demográfico	Machos	Hembras
CNmina	<i>n</i>	18	13
	Edad±D.Est	3,11±0,71 ^A	3,08±0,79 ^A
	(rango)	(2 – 4)	(2 – 4)
Piletas	<i>n</i>	26	8
	Edad±D.Est	3,37±0,83 ^A	3,35±0,54 ^A
	(rango)	(3 – 5)	(3 – 4)
A°V	<i>n</i>	9	14
	Edad±D.Est	3,25±0,83 ^A	3±0,99 ^A
	(rango)	(2 – 4)	(2 – 5)

Los parámetros demográficos calculados en los diferentes sitios de muestreo se encuentran resumidos en la Tabla 17. La edad a la madurez sexual es 2 años para los individuos procedentes de CNmina y A°V, mientras que los individuos de las Piletas alcanzan la madurez recién a los 3 años. El potencial reproductivo fue de tres años en todos los casos menos en las hembras de las Piletas, el cual fue de 2 años.

Tabla 17. Parámetros demográficos de las diferentes poblaciones de *R. arenarum* estudiados hasta el momento.

Sitio	Edad (años) a la madurez sexual		LHC (mm) a la madurez sexual		Longevidad (años)		Potencial reproductivo	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
CNmina	2	2	78,37±4,25	88,17±8,17	4	4	3	3
Piletas	3	3	83,15±3,36	98,06±4,82	5	4	3	2
A°V	2	2	75,12	84,17±6,31	4	5	3	4

4.4.1.3. Modelos de Crecimiento poblacional de *R. arenarum*

Los modelos de crecimiento de von Bertalanffy, (1938) ajustaron correctamente la relación entre edad/tamaño del cuerpo (r^2). Las curvas de crecimiento estimadas por los modelos mostraron una forma similar en machos y en hembras (Fig. 28) pero los coeficientes de crecimiento fueron algo mayores en machos (Tabla 18), indicando que

estos alcanzan el tamaño máximo más rápido que las hembras. Para ambos sexos en los sitios Piletas y A°V el LHCmax estimado por el modelo, fue mayor que el LHC máximo registrado hasta el momento, mientras que el LHCmax estimado para CNmina fue coincidente con el registrado en las muestras. Si bien se observan diferencias en todos los parámetros medios de crecimiento de las poblaciones, solo fueron significativamente mayor los LHCmax estimados de machos y hembras de A°V con respecto a CNmina, debido a que no hubo solapamiento de los intervalos de confianza (IC 95%).

Tabla 18. Parámetros de crecimiento en cada sitio de estudio estimado por el modelo de crecimiento de von Bertalanffy. Se muestra el *n*, la media \pm desvío estandar y los intervalos de confianza (IC 95%) de cada variable. Para todas las estimaciones fueron incluidos recién metamorfoseados, juveniles y adultos.

Sitio	Sexo	LHCmax	K	(r ²)
CNmina	Machos (26)	101,6 \pm 4,95 (91,3 - 113)	0,7 \pm 0,11 (0,49 - 0,92)	74,4%
	Hembras (21)	105,8 \pm 4,08 (97 - 114)	0,76 \pm 0,11 (0,53 - 0,96)	80,01%
Piletas	Machos (28)	102 \pm 3,42 (94,8 - 109,1)	0,77 \pm 0,10 (0,55 - 0,97)	67,32%
	Hembras (11)	135,1 \pm 13,6 (95,7 - 160)	0,42 \pm 0,12 (0,18 - 0,69)	69,85%
A° V	Machos (18)	125,5 \pm 7,95 (104,4 - 145)	0,39 \pm 0,06 (0,27 - 0,5)	90,12%
	Hembras (23)	136,5 \pm 10,7 (113 - 156,1)	0,4 \pm 0,06 (0,26 - 0,51)	88,36%

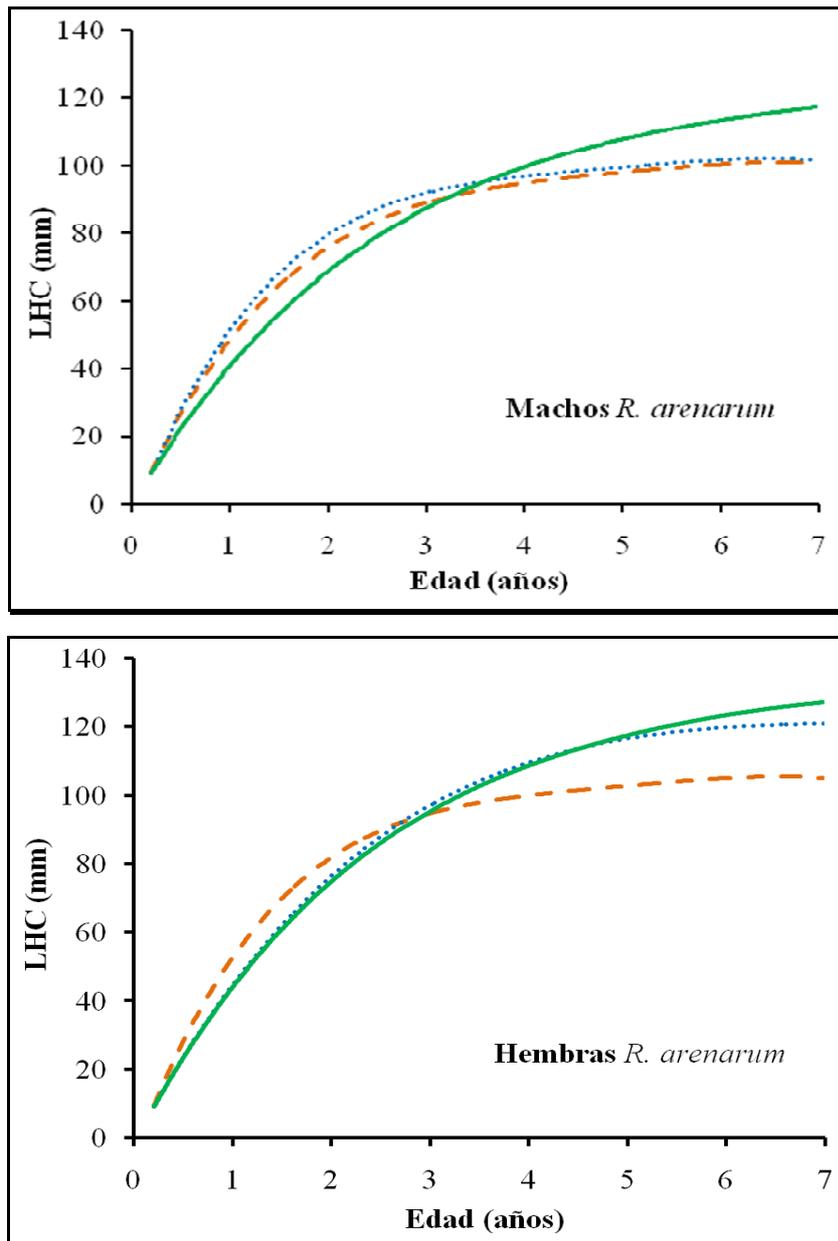


Figura 28. Curvas de crecimiento poblacional de *R. arenarum* estimadas por el modelo de von Bertalanffy para cada sexo y sitios de muestreo. CNantes=Naranja; Piletas=Azul; A°V=Verde; A°H=Rojo.

4.4.1.4. Crecimiento óseo de *R. arenarum*

Se analizaron cortes de hueso de 17 individuos procedentes de CNmina, 12 individuos de las Piletas y 9 procedentes del A°V. Los valores medios de área ósea se muestran en la figura 29.

El área absoluta de hueso discriminado por edad mostro un valor significativamente menor en los individuos procedentes del CNmina. Mientras que el área ósea no fue diferente entre los sitios Piletas y A°V (Tabla 19).

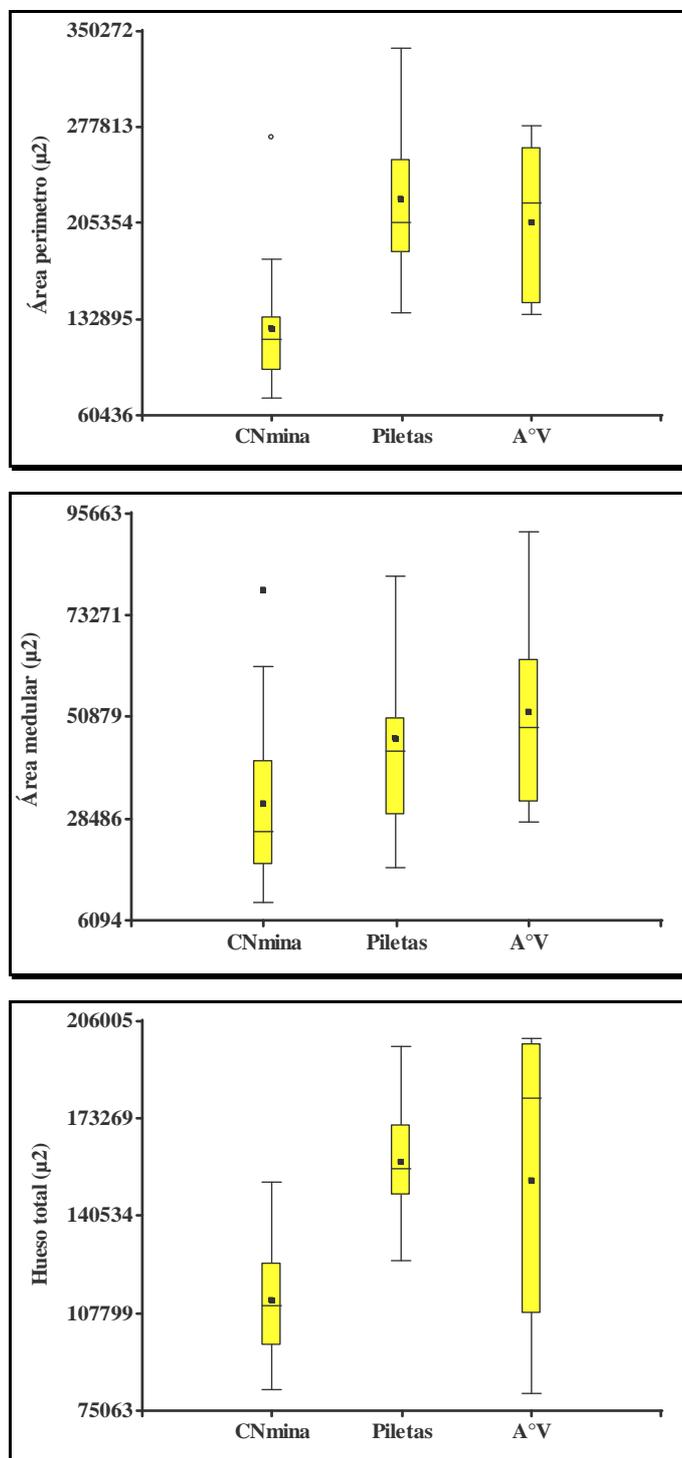


Figura 29. Diagrama de caja con la Comparación del área ósea media de *R. arenarum* en los diferentes sitios de estudio.

Tabla 19. Área absoluta de hueso (μ^2) de *R. arenarum* discriminado por sitio y edad.

Sitio	Edad en años			
	2	3	4	5
CNmina	82045±2064 ^A	118037±1563 ^A	90571±1689 ^A	-
Piletas	-	148167±1691 ^B	151086±2762 ^B	207560±3784
A°V	125699±3860 ^B	137796±4459 ^B	189373±2729 ^B	-

4.4.2. *Boana cordobae*

4.4.2.1. Variables morfométricas en adultos de *B. cordobae*

La especie *B. cordobae* se registró en todos los sitios propuestos. En los sitios A°H y Piletas es donde se capturaron la mayor cantidad de individuos, 45 individuos (14 hembras y 31 machos) y 43 individuos (11 hembras y 32 machos), respectivamente. Mientras que los sitios con menor cantidad de capturas fueron, A°V (n=34; 20 hembras y 14 machos) y CNantes de la mina (15 machos). Durante las temporadas de muestreo se han recapturado 7 individuos en CNantes, 3 en las Piletas y 3 individuos en A°H. Todos los recapturados pertenecían al sitio de origen donde fueron capturados por primera vez. En la totalidad de los casos los individuos fueron pesados, medidos con calibre (LHC) y se realizó el corte de falange con el marcado correspondiente.

Comparando la variables morfométricas de los machos de *B. cordobae* entre los diferentes sitios de muestreo, se observan diferencias significativas en el tamaño (LHC: $F_{3,67}= 19,64$ $P<0,01$), el Peso (P: $F_{3,67}= 9,46$ $P<0,01$) y la condición corporal (CC: $H=19,02$ $P<0,01$). Particularmente los individuos de A°H poseen un largo y un peso significativamente menor que los individuos del resto de los sitios (Tabla 20).

Considerando las variables morfométricas de las hembras de *B. cordobae*, se observaron diferencias significativas en el tamaño (LHC: $F_{2,17}=6,59$ $P<0,01$) y la condición corporal (CC: $F_{2,17}=5,04$ $P<0,01$), mientras que el peso no fue diferente ($F_{2,17}=2,41$ $P=0,11$) (Tabla 20).

Tabla 20. Valores medios para el largo hocico-cloaca (LHC), Peso y condición corporal (CC) por sexo y sitio de muestreo.

Sitio	Machos			Hembras		
	LHC (mm)	Peso (g)	CC	LHC (mm)	Peso (g)	CC
CNantes	51,01±3,9 ^A (42-55,37)	8,9±1,6 ^A (6,2-12)	0,068±0,012 ^A (0,05-0,094)	Sd	Sd	Sd
Piletas	47,84±3,24 ^A (43,26-54)	9,9±2,2 ^A (7-15,5)	0,09±0,011 ^B (0,063-0,111)	52,26±2,6 ^A (49-55)	12,7±2,1 ^A (9,6-16,1)	0,089±0,011 ^A (0,073-0,104)
A°V	51,06±2,53 ^A (44-58,26)	8,9±1,7 ^A (6,7-13,6)	0,071±0,02 ^A (0,058-0,109)	54,09±2,57 ^A (45-60)	13,2±1,6 ^A (8,6-17,3)	0,08±0,003 ^A (0,064-0,121)
A°H	43,89±3,70 ^B (39,8-51,5)	7,4±1,6 ^B (6,3-11,2)	0,09±0,016 ^B (0,061-0,121)	45,27±6,81 ^B (39-52)	10,0±3,9 ^A (8,4-15,1)	0,10±0,017 ^B (0,075-0,124)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Sd: Sin datos

4.4.2.2. Demografía Poblacional de *Boana cordobae*

Se utilizaron un total de 71 individuos (10 Recién Metamorfosados, 1 Juvenil, 39 Machos adultos y 21 Hembras adultas. En todos los individuos de *B. cordobae* estudiados mediante la técnica de esqueletocronología se pudieron observar líneas de detención de crecimiento (LAG) bien definidas en el periostio, que permitió determinar la edad en años que poseen (Fig.30).

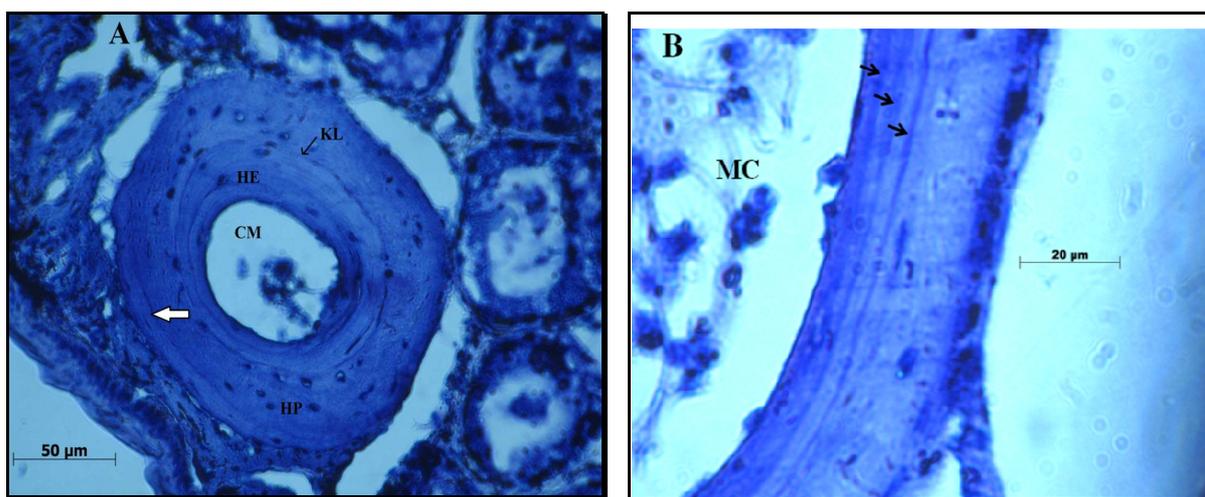


Figura 30. A) Macho de *B. cordobae* A°V (40x). CM: Cavidad Medular. KL : Línea de Kastschenko. HE: Hueso Endosteal. HP: Hueso Periosteal. Flecha Blanca: LAGs – B) Macho de *B. cordobae* A°V (100x). Flechas indican las 3 LAGs que se observan en el corte. Foto: Manuel A. Otero

El LHC de las hembras fue significativamente mayor que el LHC de los machos (Wilcoxon, $W = 801$; $P < 0,05$). Las hembras fueron más pesadas que los machos ($W = 785,5$; $P < 0,01$). La edad promedio no se diferenció entre sexos ($W = 714$; $P = 0,205$), ver Tabla 21.

Tabla 21. Largo Hocico-Cloaca (LHC in mm), Peso (g) y Edad (años) de *B. cordobae*.

	R. Meta. (n=10)	Juvenil (n=1)	Machos (n=44)	Hembras (n=27)
LHC	28,94 ± 1,93 (25,8 - 31,9)	35,1	48,01 ± 4,99 (38 - 56,26)	51,27 ± 5,06 (41,15 - 58)
Peso	1,91 ± 0,32 (1,38 - 2,35)	4,01	9,03 ± 2,44 (4,5 - 15,1)	12,3 ± 2,53 (8,2 - 17,4)
Edad	0,4	1	3,18 ± 0,64 (2 - 5)	3,47 ± 0,87 (2 - 5)

Los parámetros demográficos y las características de historias de vida mostraron algunas diferencias entre machos y hembras de *B. cordobae* (Tabla 22).

Tabla 22. Parámetros demográficos de *B. cordobae*. Media ± desvío (rango) se muestran para cada variable. A= Moda de la edad (frecuencia); MS= Edad de madurez sexual; L= Longevidad; PR= Potencial reproductivo.

Sexo	n	A	MS	L	PR	LHC a MS	Peso (g) a MS
♂	44	3 (58,9%)	2	5	3	41,5 ± 2,8 ^A (38,9-44,6)	6,8 ± 1,71 ^A (5,1-8,9)
♀	27	3 (47,3%)	2	5	3	43,42 ± 1,9 ^A (41,35-45)	8,9 ± 0,81 ^B (8-9,6)

EL LHC y Peso estuvo significativamente correlacionado con la edad en ambos sexos (Pearson's correlations: LHC Machos, $r = 0,31$, $P < 0,01$; LHC Hembras, $r = 0,60$, $P < 0,01$; Peso Machos, $r = 0,16$, $P < 0,01$; Peso Hembras, $r = 0,46$, $P < 0,01$). Cuando el efecto de la edad fue controlada se detectaron diferencias significativas en el LHC (ANCOVA; $F_{1,57} = 25,41$, $P < 0,01$) y el Peso (ANCOVA; $F_{1,57} = 24,27$, $P < 0,01$) entre sexos.

El modelo de crecimiento de von Bertalanffy ajustó correctamente la relación Edad/LHC ($r = 0,912$ en Machos y $r = 0,969$ en Hembras) (Fig. 31). El coeficiente de crecimiento fue algo mayor el machos que en hembras ($k \pm CI$, machos: $0,347 \pm 0,093$; hembras: $0,298 \pm 0,078$). Pero el LHC máximo estimado por el modelo fue mayor en hembras que en machos (machos: $60,71 \pm 4,64$ mm; hembras: $64,91 \pm 5,81$ mm).

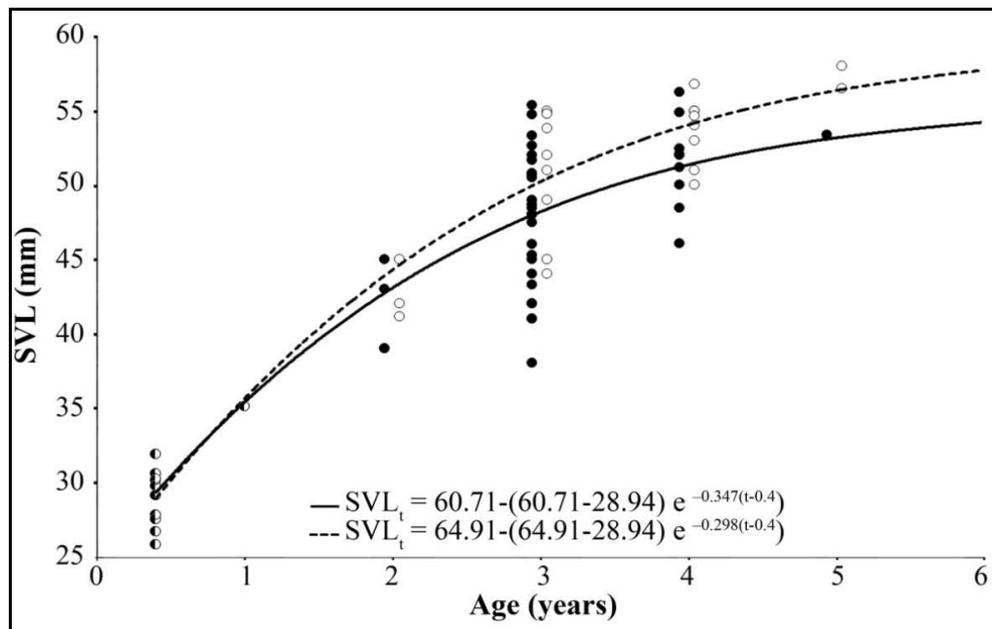


Figura 31. Curvas de crecimiento estimadas por el modelo de von Bertalanffy para *B. cordobae*. Hembras (curva punteada) y machos (curva sólida).

4.4.2.3. Análisis demográfico comparativo de *B. cordobae* entre los diferentes sitios de estudio

La reabsorción endosteal estuvo presente en algunos individuos de los diferentes sitios (CNantes: 42,8%; Piletas: 35,71%; A°V: 33,3% y A°H: 27,27%) pero en ningún caso obstaculizó la determinación de la edad debido a que la primer LAG nunca fue completamente reabsorbida. En algunos casos, las LAGs más exteriores se encontraron muy juntas y cerca del borde del periostio, pero en sitio de inserción de ligamento se pudo observar y contabilizar las líneas para determinar la edad correctamente.

La comparación entre sitios mostró que no hay diferencias en la edad promedio de las hembras ($H=0,84$; $P=0,618$). Mientras que para los machos se encontraron diferencias significativas en la edad promedio ($H=12,13$; $P<0,01$) de las poblaciones estudiadas.

Correspondiendo a A°H los de menor edad media y a CNantes los de mayor edad (Tabla 23).

Tabla 23. Edad (años) promedio \pm Desvío Estandar y Rango (); de los individuos de *B. cordobae* discriminados por sitio y sexo.

Sitio	Machos	Hembras
CNantes	14 3,72 \pm 0,64 ^B (3 – 5)	Sd
	25 3,4 \pm 0,58 ^{AB} (3 – 5)	9 3,41 \pm 0,53 ^A (3 – 4)
A°V	12 3,55 \pm 0,63 ^B (2 – 5)	17 3,85 \pm 0,73 ^A (2 – 5)
	23 2,81 \pm 0,61 ^A (2 – 4)	14 3,32 \pm 0,99 ^A (2-5)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (P>0,05). Sd: Sin datos.

Los parámetros demográficos calculados de *R. arenarum* en los diferentes sitios de muestreo se encuentran resumidos en la Tabla 24. La edad a la madurez sexual es tres años para los individuos procedentes de CNantes, Piletas y A°V, mientras que los individuos de A°H alcanzan la madurez a los dos años. El tamaño al cual alcanzan la madurez sexual es mayor en A°V. El potencial reproductivo se vió reducido a dos años en las Piletas, mientras que para las poblaciones de los otros sitios es tres años y cuatro años para las hembras de A°H.

Tabla 24. Parámetros demográficos de las diferentes poblaciones de *B. cordobae*.

Sitio	Edad (años) a la madurez sexual		LHC (mm) a la madurez sexual		Longevidad (años)		Potencial reproductivo	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
CNantes	3	-	46,38 \pm 3,79	-	5	-	3	-
Piletas	3	3	47,04 \pm 1,97	51,20 \pm 2,53	5	4	3	2
A°V	2	2	49,83 \pm 3,39	55,90 \pm 2,96	5	5	4	4
A°H	2	2	41,86 \pm 0,91	45,57 \pm 4,34	4	5	3	4

4.4.2.4. Modelos de Crecimiento poblacional de *B. cordobae*

Los modelos de crecimiento de von Bertalanffy, (1938) ajustaron correctamente la relación entre edad/tamaño del cuerpo (r^2). Las curvas de crecimiento estimadas por el modelo de von Bertalanffy mostraron una forma similar en machos y en hembras (Fig. 32) pero los coeficientes de crecimiento fueron algo mayores en machos (Tabla 25), indicando que estos alcanzan el tamaño máximo más rápido que las hembras. Si bien se observan diferencias en la mayoría de los parámetros medios de crecimiento de las poblaciones, estas no fueron estadísticamente significativas debido a que hubo solapamiento de los intervalos de confianza (IC 95%).

Tabla 25. Parámetros de crecimiento de *B. cordobae* en cada sitio de estudio estimado por el modelo de crecimiento de von Bertalanffy. Se muestra el n , la media \pm desvío estandar y los intervalos de confianza (IC 95%) de cada variable. Para todas las estimaciones fueron incluidos recién metamorfoseados, juveniles y adultos.

Sitio	Sexo	LHCmax	K	(r^2)
CNantes	Machos (14)	54,7 \pm 7,1 (48,8-60,7)	0,398 \pm 0,086 (0,277-0,517)	72,11%
	Machos (25)	51,2 \pm 6,3 (40,0-58,2)	0,385 \pm 0,094 (0,279-0,491)	74,98%
Piletas	Hembras (9)	58,6 \pm 7,08 (45,3-67,3)	0,362 \pm 0,103 (0,231-0,488)	72,32%
	Machos (12)	59,1 \pm 6,45 (49,2-65,3)	0,322 \pm 0,072 (0,241-0,396)	79,98%
A° V	Hembras (17)	65,4 \pm 6,11 (59,9-71,6)	0,275 \pm 0,096 (0,188-0,368)	81,16%
	Machos (23)	66,2 \pm 5,28 (61,1-71,5)	0,253 \pm 0,088 (0,191-0,302)	88,58%
A° H	Hembras (14)	64,3 \pm 6,44 (54,4-69,4)	0,289 \pm 0,062 (0,224-0,336)	90,23%

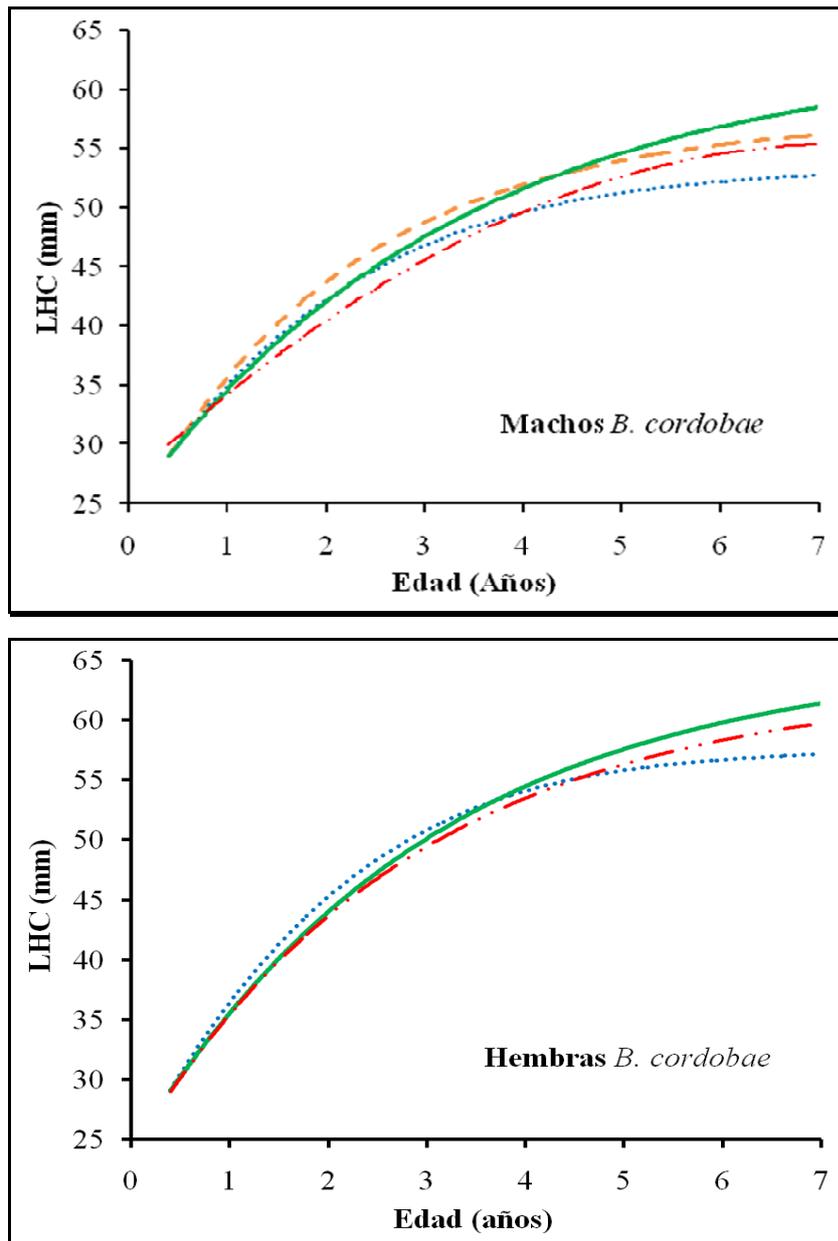


Figura 32. Curvas de crecimiento poblacional de *B. cordobae* estimadas por el modelo de von Bertalanffy para cada sexo y sitios de muestreo. CNantes=Naranja; Piletas=Azul; A°V=Verde; A°H=Rojo.

4.4.2.5. Crecimiento óseo de *B. cordobae*

Se analizaron cortes de hueso de 11 individuos procedentes de CNantes, 17 individuos de las Piletas, 15 procedentes del A°V y 13 individuos de A°H. Los valores medios de tamaño de hueso se muestran en la figura 33.

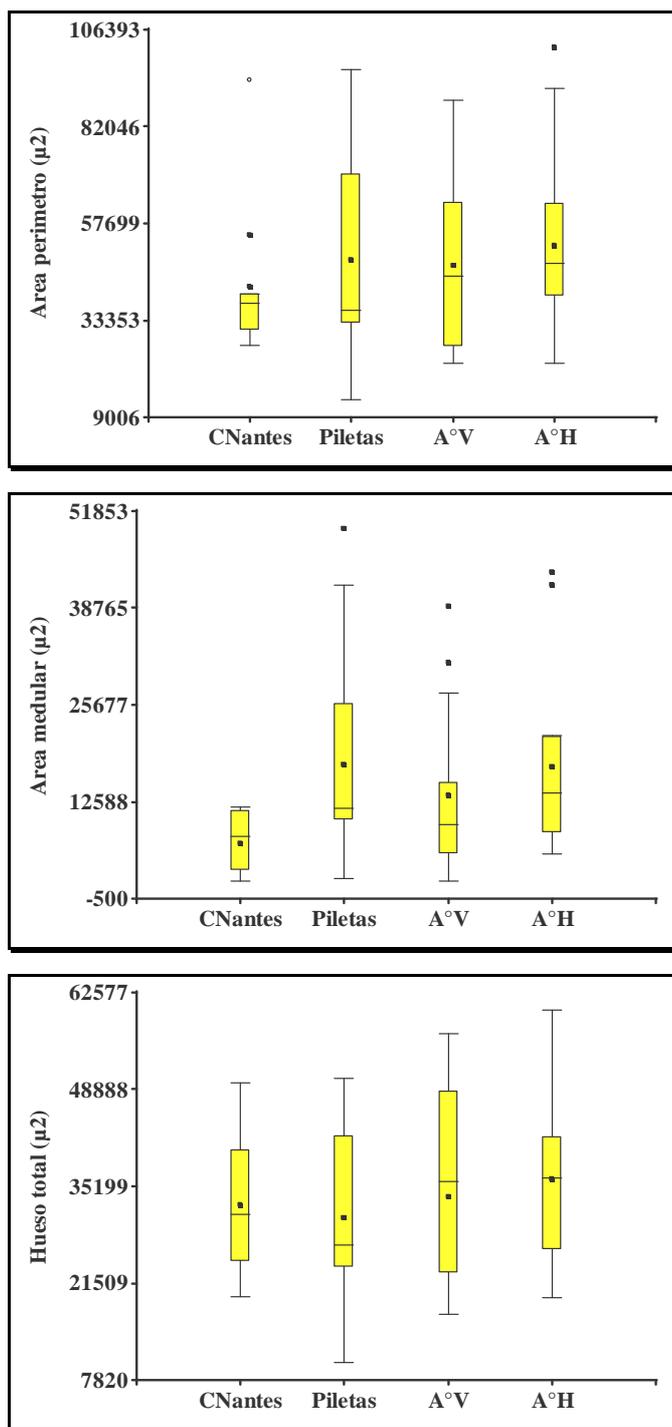


Figura 33. Diagrama de caja con la comparación de variables óseas de *B. cordobae* en los diferentes sitios de estudio.

Debido a que las poblaciones poseen diferentes edades promedio (ver, Tabla 23) es necesario controlar esta variación para comparar el tamaño de hueso entre sitios. Cuando el efecto de la edad (covariable) fue controlada se detectaron diferencias significativas en el tamaño de hueso total medio (ANCOVA; $F_{4,51} = 3,85$, $P < 0,05$) de los individuos de los

diferentes sitios (Tabla 26), siendo los individuos procedentes de A°H los que mostraron mayor crecimiento óseo.

Tabla 26. Área absoluta de hueso (μ^2) de *B. cordobae* discriminado por sitio y edad.

Sitio	Edad en años			
	2	3	4	5
CNantes	-	24986±9501	40273±7182	-
Piletas	-	29756±3405	35664±7357	-
A°V	-	28043±3839	44191±5430	40478±6270
A°H	24867±5298	38039±5923	44616±4723	-

5- DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

5.1. Caracterización de sitios y calidad de agua en la zona de estudio

5.1.1. Caracterización de sitios

Las Sierras de Córdoba se ubican en la parte sureste de las Sierras Pampeanas en la zona centro de Argentina (Baldo *et al.*, 1996). La morfología principal de las Sierras de Córdoba se constituye por tres cordones principales, la Sierra Chica, Sierra Grande y Sierra de Pocho, con una extensión Norte-Sur de 230 Km y un ancho máximo de 130 Km (Kraemer *et al.*, 1995). A su vez, la Sierra Grande incluye la Sierra de Achala al Norte y la Sierra de Comechingones al Sur (Miró, 1999; Ramos, 1999).

La provincia de Córdoba y particularmente la Sierra de Comechingones, ha sido un importante centro minero en décadas pasadas siendo muy bien conocidas las explotaciones de tungsteno, uranio, cromo, plomo, plata, zinc, cuarzo, fluorita y rocas de aplicación. En la actualidad esta actividad se restringe a extracción de minerales y rocas industriales, ya que no se registra producción de minerales metalíferos desde fines del siglo XX, con emprendimientos locales de pequeña a mediana escala que explotan áridos de origen fluvial y realizan actividades de trituración, seguidos por extracción los carbonatos para diversos usos (cemento, cal, molienda) y las arcillas. Sustancias como la serpentinita (esencialmente para uso siderúrgico), cuarzo y feldespato tienen una producción importante, con un fuerte crecimiento en la última década. A pesar de que el volumen producido no es muy alto, Córdoba es líder nacional en la producción de fluorita. Particularmente, la extracción de fluorita es reducida a una única mina, Los Cerros Negros, un emprendimiento de pequeña a mediana escala (Bonalmi *et al.*, 2014).

En relación a la mina Los Cerros Negros, a nivel de paisaje, el área es fundamentalmente natural, ya que la influencia antrópica es baja y sólo se encuentran algunos puestos serranos aislados. El uso del terreno es fundamentalmente ganadero, con ganado ovino y bovino, y algunos campos están destinados para la actividad forestal con pinares. A nivel local, al analizar la zona del emplazamiento minero, los sitios de muestreo fueron diferenciados por los ambientes litológicos por los que discurren los cuerpos de agua: Metamórficos (A°H y A°V), Graníticos (CNantes y CNmina) y Artificial (Piletas). Sin embargo, los resultados obtenidos al caracterizar cada sitio de estudio, permitieron reclasificar los sitios e identificar diferencias marcadas de los mismos, más allá del tipo de roca por el cual discurren los cuerpos de agua. En una primera instancia, se identificaron ambientes lóticos (arroyos) y lénticos (Piletas); sitios sin influencia antrópica diaria

(CNantes, A°V y A°H) y sitios influenciados por luz artificial, tránsito de personas y vehículos (CNmina y Piletas), variables relacionadas con la distancia de los sitios al campamento minero. Teniendo en cuenta la perturbación antrópica producida por la actividad minera en cada sitio (Tabla 1), estos podrían clasificarse de mayor nivel de perturbación a menor nivel de perturbación: Piletas > CNmina > CNantes > A°V ≥ A°H.

En el recorrido y caracterización de sitios, fueron identificadas y relevadas tres especies exóticas invasoras. En los sitios CNantes y A°V se identificaron dos especies exóticas de peces salmónidos, *Salvelinus fontinalis* (trucha de arroyo) y *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris). Estas especies fueron clasificadas dentro de las cien especies exóticas invasoras más dañinas del mundo por Lowe *et al.*, (2004). Ambas especies son voraces y se alimentan de larvas, crustáceos, peces y anfibios. Según Lescano, (2015) estas especies introducidas están disminuyendo la población de la ranita trepadora (*Boana cordobae*) endémica de las sierras de Córdoba. Por otro lado, en la temporada de muestreo 2016 se registró por primera vez la presencia machos vocalizando de *Lithobates catesbeianus* (Rana toro) en el sitio Piletas. Este hallazgo resulta importante ya que se conoce que *L. catesbeianus* puede impactar sobre los anfibios nativos directamente a través de la predación, interferencia por competencia, modificación del comportamiento, alteración del hábitat o introducción de enfermedades o parásitos (Boone *et al.*, 2004). La detección de especies exóticas invasoras es fundamental a la hora de analizar un ambiente, ya que las invasiones biológicas son una de las mayores amenazas que enfrentan actualmente los ecosistemas. Las especies invasoras causan graves daños a los ecosistemas terrestres y acuáticos, provocando desequilibrios ecológicos entre las poblaciones nativas, produciendo cambios en la composición de especies y en la estructura trófica de las comunidades, desplazando especies nativas, pérdida de biodiversidad, reducción de la diversidad genética y transmisión de una gran variedad de enfermedades (Kraus, 2009).

Los cambios de naturaleza global en el medio ambiente han sido reconocidos que afectan de forma muy significativa a las poblaciones de anfibios a nivel mundial (Donnelly y Crump, 1998; Carey y Alexander, 2003), a través de cambios en el ciclo hidrológico, disminución de la humedad ambiental o a través del aumento de la temperatura (McMenamin *et al.*, 2008). En zonas de climas templados, la actividad reproductiva de los anfibios está determinada en gran medida por la abundancia y distribución de las precipitaciones y las temperaturas (Duellman y Trueb, 1994).

En relación a las variables meteorológicas, registramos una temperatura media anual de 14,5°C, con máximas absolutas en los meses de verano que superaron los 26 °C y mínimas inferiores a -1 °C en invierno. La temperatura media anual coincide con lo registrado por Andreazzini (2002) en la misma zona de estudio entre los años 1994-1998, sin embargo las diferencias de temperatura absoluta registradas por Andreazzini (2002) entre invierno y verano (-15 – 25 °C) fue muy superior al registrado en este estudio, indicando una posible reducción en la estacionalidad térmica de la zona de estudio. Mientras que las precipitaciones, el valor promedio anual registrado en este estudio fue 1168 mm, mientras que Andreazzini (2002) registró valores promedio algo menores (965 mm), aunque el ciclo hidrológico se mantuvo relativamente constante, con elevadas precipitaciones (≥ 200 mm x mes) en verano y escasas precipitaciones en invierno (≤ 40 mm x mes).

Por lo antes expuesto, la identificación y correcta caracterización de los sitios resulta clave en el estudio de los ensambles de anfibios anuros en ambientes perturbados, porque la ausencia/presencia de una especie puede ser el resultado de una importante cantidad de factores bióticos y abióticos no necesariamente relacionados con el impacto o estrés que generan las actividades antrópicas (Magurran, 1988).

5.1.2. Calidad de agua

La calidad del agua de los sitios muestreados se evaluó mediante la comparación de parámetros físico-químicos con los valores máximos recomendados para el consumo humano disponible en el Código Alimentario Argentino (2012) y los valores sugeridos a nivel mundial para la protección de la biota acuática.

Los factores físicos o químicos de un ambiente pueden influir en la toxicidad de un contaminante dado, ya que pueden influenciar su biodisponibilidad ambiental, al afectar su solubilidad en agua, persistencia, afinidad por suelos (Cairns *et al.*, 1975; Hoffman *et al.*, 2003).

Los niveles de toxicidad de muchos contaminantes dependen principalmente del pH, y de la temperatura (Cairns *et al.*, 1975; Boyd, 1984; Hoffman *et al.*, 2003). En anfibios, los valores de pH para su normal desarrollo, varía entre 6,3 y 7,7 (García y Fontúrbel, 2003). Por lo tanto, un estrés ácido o alcalino puede causar trastornos genéticos

en las primeras etapas del desarrollo (Pough y Wilson, 1977). En este estudio el pH fue diferente entre los diferentes sitios, siendo el sitio Piletas el que presentó los valores más básicos, por encima de los límites óptimos para cualquier organismo acuático. Cambios en la temperatura del ambiente, como un aumento de la misma, suele estar asociado a un mayor grado de toxicidad para un contaminante (Hoffman *et al.*, 2003). La mayor temperatura registrada en Piletas se debe principalmente a que durante el proceso de flotación de la fluorita, el agua es calentada a 28 °C. En anfibios, la temperatura influye en varias actividades metabólicas, como las tasas de deshidratación e hidratación, pero más importante aún, es conocido que la temperatura afecta su tasa de desarrollo (Duellman y Trueb, 1994).

La salinidad es una variable que hace referencia a la cantidad de iones inorgánicos disueltos en el agua o el suelo y pueden ser expresados en términos de corriente eléctrica (Conductividad eléctrica, medida en Siemens por metro). Por lo tanto, la conductividad comúnmente se utiliza como medida de salinidad. En las aguas continentales, la salinidad puede variar de 10 mg/l a 100 g/l y es un importante factor que limita la distribución de la biota (Cañedo Arguello *et al.*, 2013). De acuerdo a la clasificación realizada por Venice (1959) el agua superficial de los sitios muestreados se puede dividir en dos: agua dulce <0,5 g/l-1 para todos los arroyos y oligohalinos entre 0,5 - 4,0 g/l para el sitio Piletas. Una alta salinidad influye sobre los organismos de agua dulce, ya que estos, necesitan mantener una presión osmótica interna en relación con el medio en el que viven. Por lo tanto, cuando la concentración de sal del medio se vuelve demasiado elevada, los mecanismos osmorregulatorios pueden colapsar terminando en el daño celular y posiblemente la muerte (Cañedo Arguello *et al.*, 2013). Chambers (2011) en su estudio registró un aumento de los niveles basales de corticosterona en salamandra (*Ambystoma jeffersonianum*) como resultado del aumento de la conductividad, lo que indicaría una respuesta de estrés que podría afectar el crecimiento.

El oxígeno disuelto registrado en todos los sitios estudiados mostró valores comparables a lecturas bajo condiciones estándares para un normal crecimiento y desarrollo larval (oxígeno disuelto $\geq 60\%$) (Gauthier *et al.*, 2004). El sitio Piletas fue donde se encontraron los valores más bajos, quizás esto se deba a la turbidez que presenta el agua, impidiendo la colonización de algas y macroalgas, y fundamentalmente, por ser un ambiente léntico.

En los efluentes del sitio Piletas fueron registrados altas concentraciones de los iones mayoritarios (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} y HCO_3^-), esto podría estar asociado a que durante el proceso de flotación se adicionan ciertos productos químicos como soda cáustica, silicato de sodio, ácido clorhídrico y diferentes flocculantes.

En las Piletas se registraron concentraciones elevadas de Cl^- (352 mg/l). Estos valores exceden los niveles recomendados por la US Environmental Protection Agency, donde indican que la concentración promedio de Cl^- no debe superar los 220 mg/l para la protección de la vida acuática (EPA, 1988). Asociado al Cl^- , el Na^+ también siempre presentó valores superiores a los recomendados. Las cantidades excesivas de iones cloruro y sodio pueden alterar la función y estructura de los ecosistemas (Sanzo y Hecnar, 2006; Collins y Rusell, 2009), ya que se conoce que una exposición prolongada a concentraciones de Cl^- sobre 220 mg/l es perjudicial para las especies acuáticas (Kaushal *et al.*, 2005; Collins y Rusell, 2009). Particularmente en los anfibios, se conoce que pueden ejercer efectos tóxicos agudos y crónicos por la degradación de la calidad del hábitat, causando anomalías en el desarrollo, crecimiento y disminución del tiempo de metamorfosis (Sanzo y Hecnar, 2006).

Mientras que el F estuvo presente en todos los sitios por encima de los límites sugeridos (0,12 mg/L) por el Canadian Council of Ministers of Environment (CCME 2002). Los sitios CNmina y Piletas presentaron valores por encima del propuesto (0,5 mg/L) por Camargo (2003) y al valor sugerido (1,4 mg/L) por el gobierno Argentino (Ley 24051, 1992).

El arsénico (As^+) generalmente se encuentra asociado con el F^- (Rosso *et al.*, 2011). Los efectos tóxicos del arsénico y del fluoruro cuando se administran por separado, han sido ampliamente estudiados y son bien conocidos, pero los efectos biológicos de las posibles interacciones cuando la exposición es simultánea han sido escasamente estudiados, y los resultados son controvertidos (Barbier *et al.*, 2010). La detección de As^+ presentó valores muy bajos en los arroyos analizados debido a que la composición misma de las rocas de la zona de estudio muestran escasa cantidad; estando por debajo de los límites máximos sugeridos para la protección de la biota acuática en ecosistemas de agua dulce según autoridades internacionales (0,005 mg/l en Canadá) como nacionales (0,015 mg/l). Mientras que la aparición de As^+ en elevadas concentraciones en el agua de las Piletas se debe a la actividad extractiva que se realiza en el lugar.

Como resultado de la actividad minera, el agua asociada a esta actividad incrementa 30 a 40 veces las concentraciones de SO_4^- y por lo tanto repercute finalmente en un aumento de alrededor de 10 veces los valores de conductividad y salinidad (Cañedo Arguello *et al.*, 2013). Este fenómeno se registró solo en el sitio artificial Piletas y no en los sitios naturales, lo que confirmaría que no existe filtración de agua de sitio Piletas hacia los arroyos.

5.2. Ensamble de anfibios

Distintos trabajos analizan la influencia de la heterogeneidad espacial y ambiental en la diversidad y riqueza de especies de anfibios (Pearman, 1997; Gray *et al.*, 2004; Peltzer *et al.*, 2003; Peltzer *et al.*, 2006; Schaefer, 2006; Keller *et al.*, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2009). Las perturbaciones dentro de un hábitat reducen el número de nichos y aumentan la variabilidad de las condiciones físicas, lo cual conduce a una reducción de la riqueza, diversidad y equitatividad de especies (Hazell *et al.*, 2001; Peltzer y Lajmanovich, 2001; Peltzer *et al.*, 2003).

La manera más directa de caracterizar una comunidad o ensamble de anuros es por mediante el estudio del número de especies presentes, es decir, a través de su riqueza (Feisinger, 2003). Rapport *et al.*, (1985) destacan la reducción de la riqueza de especies como uno de los indicadores generales de que un ecosistema presenta un síndrome de “insuficiencia”. Este parámetro fue útil para explorar las diferencias entre los ensambles analizados, teniendo en cuenta que, los sitios pertenecientes a un ambiente granítico afectados por la actividad minera presentan una riqueza de 2 especies (CNantes y CNmina). Mientras que los sitios que se encuentran en ambientes de roca metamórfica y sin modificación antrópica presentan una riqueza específica de 4-5 especies (A°H y A°V, respectivamente). Un párrafo aparte merece el sitio Piletas, el cual posee una riqueza de 5 especies a pesar de representar un ambiente plenamente artificial y perturbado. Un trabajo realizado por Schaefer (2006) en campos arroceros, demostró que estos ambientes representan sitios con baja riqueza de anuros pero con una abundancia elevada, indicando que estos ambientes pueden soportar poblaciones numerosas de anfibios anuros. Según nuestros resultados, los sitios CNantes y CNmina no solo tienen baja riqueza, sino que también representarían ambientes no aptos para soportar grandes poblaciones. Esto último podría deberse a las características propias de dichos sitios, mostrando velocidad de

corriente y caudal elevado, vegetación escasa en el lecho y en los márgenes de los arroyos analizados.

Los ambientes alterados pueden presentar una variación importante en sus condiciones físicas relacionadas con la estructura del paisaje, su topografía e hidroperiodo (Hazell *et al.*, 2001; Peltzer *et al.*, 2003); dependiendo de las características de historias de vida, algunas especies del ensamble de anfibios podrán ser más o menos afectadas por la variación en estas condiciones. Según la caracterización de los sitios, observamos que las Piletas de decantación es un sitio artificial muy perturbado, con concentraciones elevadas de iones y materiales en suspensión, pero contrariamente a lo esperado el ensamble de anfibios presentes es diverso y abundante. Esto puede deberse a una serie de factores registrados en las Piletas: es un sitio estable durante todas las épocas del año, no depende del hidroperíodo natural de la zona, la temperatura del agua es mayor que la de los arroyos naturales incluso en períodos desfavorables del clima regional, es un sitio con iluminación artificial lo que podría aumentar la concentración de ítems alimenticios (insectos). Mientras que la estructura del ensamble de anfibios en los sitios CNantes y CNmina es el esperado, ya que son sitios que poseen eventos de intervención antrópica de alto impacto como por ejemplo las voladuras de materiales para el procesamiento minero, cambios del curso de los arroyos, elevado porcentaje de materiales en suspensión, altos niveles de “ruido” producido por la trituración del material y las maquinarias y una permanente actividad antrópica. Este resultados concuerdan con un estudio realizado en Perú donde se encontró que en las concesiones donde se ha realizado explotación minera se ha registrado una disminución en el número y abundancia de especies de anfibios que a su vez está relacionado con la destrucción y contaminación del hábitat producto de la explotación minera por parte de diferentes empresas (Aguilar *et al.*, 2012).

La ausencia de una especie en un sitio contaminado a menudo supone una consecuencia de contaminación. Sin embargo, como ya postulamos antes, la ausencia de esta especie puede ser el resultado de diversos factores bióticos y abióticos no relacionados con el estrés producido por la contaminación (Magurran, 1988). Las especies más representativas de los ensambles estudiados fueron *Boana cordobae* y *Rhinella arenarum*. Dependiendo de las características de historias de vida, las especies de anfibios responden de manera distinta a las alteraciones y modificaciones de su hábitat, siendo algunas especies en su conjunto más tolerantes a las perturbaciones (Schmutzer *et al.*, 2008; Burton *et al.*, 2009; Bionda *et al.*, 2011). Según Keller *et al.*, (2009) las especies de anfibios de

hábitos generalistas en sus requerimientos de hábitats, son más tolerantes a la variación de las condiciones ambientales. *R. arenarum* es considerada una especie conspicua, generalista en sus requerimientos de hábitat y presente tanto en ambientes urbanos como rurales (Bionda *et al.*, 2011; Bionda *et al.*, 2012). Esta especie se registró en sitios cercanos al establecimiento minero (CNmina, Piletas y A°V) independientemente de la alteración antrópica registrada en los mismos. Debido a que *R. arenarum* tiene hábitos domésticos (Maneyro y Carreira, 2012), su ausencia en CNantes y la baja abundancia en A°H no estaría relacionada directamente al desarrollo de actividades mineras, sino a que estos sitios de estudio se encuentran alejados del campamento minero. Babini *et al.*, (2015a), en un estudio de ensambles de anfibios anuros en ambientes urbanos, sugiere que *Boana pulchellus* es frecuente en ambientes de vegetación abundante y de mayor altura, por lo que es más propenso a disminuir en ambientes alterados. Por consiguiente, la presencia de especies de hábitos arbóreos podría constituir una variable respuesta para medir la alteración de los ambientes (Babini *et al.*, 2015a). *B. cordobae*, de hábitos arbóreos, es considerada una especie bioindicadora y suele encontrarse en sitios poco perturbados (Pollo *et al.*, 2016). Sin embargo, se distribuyó en todos los sitios estudiados indistintamente de la alteración antrópica. Esto podría deberse a la presencia de una densa vegetación palustre en todos los sitios analizados y a la fuerte correlación que tiene *B. cordobae* con dicha vegetación para vocalizar y oviponer (Barrio, 1965). Además, estaría indicando que la riqueza y la cobertura de especies vegetales en cuerpos de agua, se encuentran relacionadas con la riqueza y abundancia de especies de anfibios (Knutson *et al.*, 2004; Peltzer *et al.*, 2008) lo cual concuerda con la presencia exclusiva de *Melanophryniscus stelzneri* en los sitios A°H y A°V en los cuales la presencia de mallines y cobertura vegetal es elevada.

En los ambientes más alterados por la actividad minera, algunas especies fueron abundantes y frecuentes durante algunos de los años de muestreo y resultó notoria su disminución para otros periodos de análisis. Por su parte, en los sitios menos alterado (A°V y A°H), la composición de especies en el ensamble varió levemente entre los tres años de trabajo. Asimismo, las curvas de rarefacción indican que el número de muestreos realizados fue suficiente en cada sitio, mostrando una aproximación realista del número de especies que componen cada ensamble.

Características especie-específica, según pertenezcan las especies a hábitos más terrestres o acuáticos, podrían explicar un mayor o menor efecto negativo en las

poblaciones si ocurriera una alteración en su ambiente. Keller *et al.*, (2009), propone que las especies de anfibios de hábitos más terrestres, son más generalistas en sus requerimientos de hábitats, y por ello, más independientes de las variables ambientales. Por otra parte, la posible modificación de los ambientes acuáticos, permite presuponer que aquellas especies de hábitos más acuáticos, pueden ser más sensibles a las alteraciones de los ambientes. El trabajo realizado por Peltzer *et al.*, (2006), si bien corresponde a agroecosistemas, es concluyente al respecto, ya que en los ambientes alterados se encontró una mayor representatividad de las especies de anuros correspondientes al gremio terrestre, seguido del gremio semiacuático, y una declinación notable del gremio exclusivamente acuático. Nuestras observaciones realizadas en un ambiente minero arrojaron resultados controversiales. Por un lado, lo observado en las piletas de decantación coincide con los antecedentes planteados, ya que corresponde al sitio más perturbado y en el mismo registraron especies con hábitos terrestres (*R. arenarum*, *O. cordobae*, *L. mistacinus*, *L. gracilis*), y solo una especie arbórea semiacuática (*B. cordobae*). Por otro lado, en los ambientes menos perturbados (A°V y A°H) se esperaba una mayor presencia de especies con hábitos semiacuáticos y acuáticos, pero se observó una configuración de especies similar a las Piletas, con cuatro especies de hábitos terrestres (*R. arenarum*, *L. latinasus*, *L. gracilis*, *M. stelzneri*) y una especie arbórea semiacuática (*B. cordobae*). En los ambientes con perturbación intermedia (CNantes y CNmina) si bien, se observaron solo dos especies en cada sitio, se registró la única especies de hábitos acuáticos (*L. latrans*) del estudio. Esta controversia en los resultados obtenidos, podría indicarnos que las perturbaciones observadas no son suficientes como para condicionar una configuración de especies con hábitos diferentes en cada sitio.

5.3. Crecimiento y desarrollo larval

Los ensayos biológicos de ecotoxicidad son herramientas de diagnóstico ambiental adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba, complementarios a los análisis fisicoquímicos y a los Índices de Calidad del Agua (ICAs). Los mismos pueden llevarse a cabo bajo condiciones experimentales específicas y controladas en laboratorio o a campo (Castillo Morales *et al.*, 2004). Además, las mediciones sobre los organismos (puntos finales) en la etapa embrionaria y larval (crecimiento, desarrollo, supervivencia, anomalías morfológicas) son indicadores de alerta

temprana a condiciones ambientales desfavorables, porque muchas de las respuestas a estos niveles ocurren en un corto tiempo de exposición a un factor estresante y permiten diagnósticos relativamente rápidas de las condiciones ambientales (Hawkins, 2007).

Es necesario destacar que los experimentos de microcosmos y jaulas de exclusión in situ, permitieron descartar posibles efectos genéticos propios de las poblaciones de cada sitio, ya que las larvas desarrolladas en las distintas experiencias, provenían de los mismos progenitores.

Nuestros resultados muestran un efecto de las elevadas concentraciones de iones en los cuerpos de agua sobre el crecimiento y desarrollo larval. Principalmente se ven afectadas las tasas de desarrollo y la mortalidad larval en el sitio Piletas donde la perturbación es más pronunciada. Recientemente, se ha sugerido que los factores estresantes ambientales crónicos experimentados durante las primeras etapas de la vida pueden incluir efectos acumulativos que deben tenerse en cuenta al evaluar las consecuencias ecológicas del cambio en el ambiente sobre las poblaciones (Crespi y Warne, 2013).

Numerosos estudios han reportado un efecto adverso del Flúor en animales acuáticos incluyendo caracoles, peces y anfibios (Alonso y Camargo, 2011a, 2011b, 2012; Cao *et al.*, 2013; Goh y Neff, 2003; Zhao *et al.*, 2013, Pollo *et al.*, 2016). Particularmente en anfibios Goh y Neff (2003) observaron que el fluoruro de sodio tiene efecto teratogénico en embriones de *Xenopus*. Zhao *et al.*, (2013) encontraron que la metamorfosis de *Bufo gargarizans* estuvo significativamente inhibida en ambientes con altas concentraciones de flúor.

La mortalidad observada en nuestro estudio en laboratorio fue más pronunciada en el ensayo con agua proveniente de las Piletas (46.6%) donde al igual que en estudios previos (Chai *et al.*, 2016) una concentración de Flúor superior al 10 mg/l produce toxicidad crónica con efectos teratogénicos en larvas.

La exposición prolongada a altas concentraciones de Flúor produce retrasos en el crecimiento y desarrollo larval (Chai *et al.*, 2016). Nuestros resultados, tanto en laboratorio como a campo, muestran tasas de desarrollo y crecimiento disminuido (Figura 16,18; Tabla 10,13) en las larvas de las Piletas con respecto a sitios menos perturbados como A°V. Rac *et al.*, (2005) sugieren que el crecimiento inhibido de las larvas puede estar relacionada a

elevados niveles de adenosin monofosfato (AMP), la cual puede inhibir la fosforilación oxidativa y eventualmente deprimir la función metabólica.

El reclutamiento de anfibios juveniles puede verse afectado por diferentes factores, entre ellos, el tiempo a la metamorfosis, el porcentaje de individuos que metamorfosean y la condición corporal en la que llagan a la misma (Pechmann *et al.*, 1989; Semlitsch *et al.*, 1988). Nuestros resultados indican que en los sitios CNantes, CNmina y A°V donde las concentraciones de Flúor no fueron altas (1,8 mg/l, 2,6 mg/l y 0,3 mg/l, respectivamente), no se observaron diferencias significativas en el tiempo a la metamorfosis, el número de metamorfoseados ni en las tasas de crecimiento y desarrollo. Esto concuerda con lo sugerido por Zhao *et al.*, (2013) donde sugiere que el flúor en concentraciones adecuadas no afecta e incluso promueve el crecimiento y desarrollo larval. Por otro lado a concentraciones mayores de 10 mg/l de flúor, como la observada en las Piletas (16,1 mg/l), Zhao *et al.*, (2013) sugieren que el retraso de la metamorfosis posiblemente sea resultado de un cambio en la homeostasis de la hormona tiroide (TH), regulador primario de la metamorfosis en anfibios (Miyata y Ose, 2012).

Se asume generalmente que largos periodos de desarrollo larval confieren un menor fitness a los metamorfoseados (Wilbur y Collins, 1973; Werner, 1986). Nuestros resultados concuerdan con este supuesto ya que los individuos provenientes de las Piletas demoraron más tiempo en alcanzar la matemorfosis y lo hicieron con una condición corporal reducida respecto a los individuos de CNantes, CNmina y A°V. La inhibición del crecimiento es uno de los indicadores más sensibles de toxicidad, por lo que el menor tamaño de las larvas que habitan estos ambientes puede deberse a la exposición de Iones en concentraciones aumentadas que alteran el crecimiento y desarrollo. Además, la condición estresante observada en las larvas del sitio Piletas, principalmente el tamaño pequeño a la metamorfosis, puede relacionarse a una disminución en la búsqueda de alimento como resultado directo de la metahemoglobinemia en los renacuajos (Hecnar, 1995). Disminuciones similares en el tamaño corporal se demostraron a través de análisis de larvas de *R. arenarum* de lagunas eutróficas en agroecosistemas (Bionda *et al.*, 2012). Por otro lado, Wood y Richardson, (2009) sugieren que larvas que se desarrollan en ambientes con baja transparencia muestran una supervivencia reducida y baja tasa de metamorfosis. Esto es consistente con nuestros resultados obtenidos en las Piletas, que poseen aguas con baja transparencia, en donde se obtuvieron bajos niveles de supervivencia en larvas que se desarrollaron tanto en los microcosmos como en las jaulas de exclusión.

Dados los efectos potencialmente negativos de la mezcla de contaminantes de los sedimentos sobre la aptitud física de las larvas, la mortalidad larval y la baja abundancia de individuos que alcanzaron la metamorfosis en sitios altamente perturbados, este estudio permiten inferir que la exposición crónica en estanques contaminados por aportes antropogénicos podría tener un impacto negativo significativo en la estructura de las poblaciones adultas de anfibios, pudiendo alterar de este modo la viabilidad poblacional.

Las características de las puestas, como el peso y el número de huevos (potencial reproductivo), podría representar un indicador del estado de conservación de los anfibios (Lavilla *et al.*, 2000). Sin embargo, esta información es desconocida para la mayoría de las especies neotropicales. El peso y el número de huevos promedio de las puestas de *R. arenarum* en los sitios de estudio fue similar al registrado por Sanabria *et al.*, (2007) para una población del desierto del monte de Argentina, con una media de $27,940 \pm 11,351$ huevos por cordón y por Bionda *et al.*, (2011), en agroecosistemas del centro de Córdoba, que reportó una media de $23,276 \pm 8,017$ huevos por nidada para la misma especie.

Se puede definir al huevo como al óvulo (o gameto a través de la gastrulación, etapas 1-12 de Gosner) y su membrana vitelina de origen ovárico, inmerso en la gelatina producida en el oviducto (Altig y McDiarmid, 2007). La gelatina provee soporte mecánico al óvulo, fija los huevos entre sí, aumenta la entrada de esperma congénico y previene de esperma heterospecífico (Barbieri y Del Pino, 1970). Además, se ha registrado que la gelatina protege a los huevos de contaminantes del ambiente y de depredadores o patógenos (Marquis *et al.*, 2006; Altig y McDiarmid, 2007). Según esta sentencia y en concordancia con Babini, (2017), se esperaría que puestas provenientes de sitios altamente antropizados, tengan mayor cantidad de gelatina entre huevos, lo que les conferiría mayor peso pero igual número de huevos. Sin embargo, nuestros resultados luego de analizar puestas de *R. arenarum* provenientes de las Piletas, mostraron menor peso y menor n° de huevos; lo que estaría indicando que no poseen mayor cantidad de gelatina que los proteja.

5.4. Morfometría y demografía de poblaciones adultas

Se considera que los anfibios son altamente filopátricos y cuando son adultos retornan al mismo sitio en cada período reproductivo, este sitio es muy frecuentemente el de nacimiento (Sinsch, 1990). Aquí subyace la conjetura de que los anfibios adultos,

atravesaron sus ciclos larvales en los mismos sitios donde se llevó a cabo el estudio. Además, el marcado diferencial de los individuos de cada sitio apoyó esta idea, ya que los individuos recapturados siempre correspondieron al sitio de origen y no se tuvo registro de movimiento de individuos entre sitios de estudio.

Se utilizaron datos morfométricos y la técnica de esqueletocronología para estimar tasas de crecimiento como un índice de salud fisiológica. Si bien estudios previos (Spear *et al.*, 2009) demostraron en agroecosistemas que los individuos provenientes de zonas de gran intensidad agrícola pueden tener el tamaño, peso y edad reducido con respecto a individuos provenientes de zonas menos perturbadas, en ninguno de los casos se realizaron estimaciones de crecimiento individual y poblacional. Nuestros resultados difieren en cierta medida de los autores anteriores ya que tanto para *R. arenarum* como para *B. cordobae* el tamaño, peso y condición corporal, no difirió entre sitios o incluso fue menor en los sitios de referencia menos perturbados (A°V, A°H). Comparando las medidas del peso y tamaño, contrariamente a lo esperado, los individuos adultos de Piletas fueron relativamente más grandes, más pesados y mostraron una mayor condición corporal que los individuos de arroyos. Este aumento de valor no significa necesariamente que los individuos tengan mejor estado de salud (Polo Cavia *et al.*, 2010). Un hábitat puede inducir diferencias fenotípicas en las poblaciones naturales, resultando en rasgos aparentemente sanos, como un tamaño corporal mayor que no podría correlacionarse necesariamente con la verdadera condición de salud de la población. En consecuencia, los individuos de las Piletas pueden tener una condición corporal más alta porque el ambiente presenta una alta disponibilidad de recursos alimenticios y temperaturas más cálidas que promueven la digestión y aumentan la tasa metabólica. Por lo tanto, la selección de este sitio podría explicarse por las características reproductivas y ecológicas de estas especies. La elección de las Piletas por *R. arenarum* posiblemente esté relacionada con su estrategia reproductiva, prefiriendo los estanques lénticos con incidencia directa de luz solar como sitios de oviposición (Bionda *et al.*, 2011). Además, *B. cordobae* podría elegir las Piletas porque prefiere los estanques con vegetación palustre como sitios de reproducción, favoreciendo también la disponibilidad del sitio de canto (Barrio, 1962). En consecuencia, la condición corporal de los individuos en estos sitios puede no ser un buen indicador a partir del cual se pueda evaluar la respuesta de los anuros a la contaminación debido a la actividad minera.

Varios estudios de ambientes alterados confirmaron modificaciones de algunos rasgos demográficos en poblaciones de anuros (Sinsch *et al.*, 2007; Attademo *et al.*, 2014; Zhelev *et al.*, 2014; Zamora-Camacho y Comas, 2017). La edad promedio registrada en este estudio no fue significativamente diferente entre los sitios para *R. arenarum*, pero si observamos diferencias entre sitios cuando consideramos a *B. cordobae*, con menor edad promedio para los individuos de A°H que los individuos provenientes de los sitios más alterados (CNantes, CNmina, Piletas). Sin embargo, a diferencia de muchos trabajos previos, se utilizaron modelos de crecimiento poblacional (von Bertalanffy, 1938) que relacionan el tamaño y la edad arrojando estimaciones de crecimiento, además de la estimación de parámetros demográficos de las poblaciones analizadas. Como puede observarse, las curvas de crecimiento y los parámetros estimados por los modelos de von Bertalanffy (1938) para *R. arenarum*, las tasas de crecimiento (K) son mayores en CNmina y Piletas indicando que alcanzan el tamaño máximo más rápido que los individuos de A°V, pero el tamaño máximo estimado (LHCmax) es menor en los sitios perturbados que en el sitio de referencia. Un patrón similar se observa al analizar la tasa de crecimiento (K) y el tamaño máximo estimado (LHCmax) para las poblaciones de *B. cordobae*. Los cuales predicen que las poblaciones que habitan sitios poco perturbados (A°V y A°H) dedican mayor tiempo en mantener un crecimiento prolongado y por consiguiente alcanzando un tamaño mayor a edades avanzadas que aquellas poblaciones provenientes de sitios perturbados por la actividad minera (CNmina, Piletas).

La estimación de los parámetros demográficos de poblaciones de anfibios es preciso para establecer los posibles efectos de una alteración o cambio en su ambiente, ya que a partir de los mismos, se estiman parámetros ecológicos básicos de una población (Sinsch *et al.*, 2001, 2002). Las características de los ambientes modificados antrópicamente pueden afectar la reproducción y edad generacional de los anfibios anuros (Kutrup *et al.*, 2011). Cuando analizamos los parámetros estimados para *R. arenarum* vemos que los individuos provenientes de las Piletas alcanzan la madurez sexual en el transcurso de su tercer año de vida mientras que los individuos provenientes de CNmina y A°V alcanzan la madurez a los dos años. Por otro lado, para *B. cordobae* observamos que los individuos provenientes de CNantes y Piletas alcanzan la madurez sexual a los tres años de vida, mientras que las poblaciones provenientes de A°V y A°H alcanzan la madurez a los dos años. Esto podría repercutir directamente en la diferencia que observamos en el LHC a la madurez sexual en *R. arenarum* y *B. cordobae* donde los

individuos del sitio Piletas son de mayor tamaño. Este resultado coincide con lo registrado por Attademo *et al.*, (2014), al comparar dos poblaciones de *Leptodactylus latinasus* y *Leptodactylus mystacinus* en un cultivo y en un bosque nativo, concluye en que el menor LHC promedio en el bosque podría deberse a que los individuos comienzan a reproducirse un año antes que en el cultivo.

El punto de mayor importancia es que la edad a la madurez sexual y la longevidad permitieron calcular el potencial reproductivo (PR) de las poblaciones de todos los sitios estudiados. Para *R. arenarum* las diferencias fueron leves, donde se calculó un PR de tres años en todos los casos menos para las hembras de las Piletas fue de dos años. En cambio cuando se estimó el PR para las poblaciones de *B. cordobae* se observaron diferencias importantes. Las poblaciones provenientes de los arroyos que discurren sobre roca metamórfica con baja alteración antrópica (A°H y A°V) tuvieron un PR de tres y cuatro años. Mientras que las poblaciones provenientes de sitios con mayor perturbación (CNantes y Piletas) mostraron un PR reducido de dos y tres años.

La modificación de parámetros demográficos en ambientes alterados, como un retraso en la madurez sexual, reducción de la longevidad y reducción del potencial reproductivo, fue determinado para las dos especies en este estudio y concuerda con lo hallado por otros autores (Spear *et al.*, 2009; Attademo *et al.*, 2014; Zhelev *et al.*, 2014) en ambientes con diferente grado de alteración. Estos resultados respaldan la idea de que las características de los ambientes modificados antrópicamente pueden afectar el comportamiento reproductivo y la edad generacional de los anuros (Kutrup *et al.*, 2011), lo que podría conducir a una disminución de la población a largo plazo.

En virtud de los resultados derivados del estudio de crecimiento y desarrollo larval; se observaron bajas tasas de desarrollo, altas tasas de mortalidad larval y un bajo porcentaje de individuos que alcanzan la metamorfosis en ambientes perturbados. Estos resultados indicarían que ante una menor densidad de individuos reclutados, disminuya la competencia y aquellos sobrevivientes se beneficien de los mayores recursos disponibles, alcanzando tasas de crecimiento más elevadas o tamaños y pesos superiores en la etapa terrestre. Nuestros resultados indican que los valores de tasa de crecimiento poblacional (K) en la etapa terrestre, en las dos especies estudiadas, son superiores para los sitios perturbados. Esto puede estar relacionado a lo que sugieren algunos autores (Metcalf y Monaghan, 2001; Mangel y Munch, 2005; Orizaola *et al.*, 2010), en que los organismos

poseen una alta plasticidad en la duración de sus ciclos de vida, pudiendo mitigar los efectos de un retraso en el inicio de una determinada etapa de vida al aumentar el crecimiento y el desarrollo durante las etapas posteriores con tasas de crecimiento submáximas, mostrando lo que se conoce como crecimiento compensatorio o de recuperación. Sin embargo, estos mecanismos de crecimiento compensatorios deben equilibrarse ya que pueden tener efectos sobre la supervivencia y la aptitud durante la ontogenia (Orizaola *et al.*, 2010). El retardo en alcanzar la madurez sexual, la longevidad reducida y el menor potencial reproductivo de las poblaciones de anfibios que habitan ambientes perturbados (Piletas), podrían ser el efecto directo del gasto energético que conlleva el crecimiento compensatorio en las primeras etapas del ciclo de vida en la tierra para compensar los limitados eventos reproductivos con un mayor esfuerzo en cada uno.

Considerando las características especie-específicas, dependiendo si son especies de hábitos terrestres, arborícolas o acuáticas, pueden explicar un mayor o menor efecto en la población si ocurre una alteración en el ambiente (Keller *et al.*, 2009). En este sentido resultó valiosa la utilización de dos especies con hábitos reproductivos y ecológicos diferentes, ya que el análisis demográfico de las poblaciones adultas arrojó diferencias entre especies en los parámetros afectados por la actividad minera. Según nuestros resultados la especie más afectada fue *B. cordobae*. Esta tendencia se reflejó principalmente en la variación de las variables morfométricas, en el reducido LHCmax estimado y en el menor potencial reproductivo de sus poblaciones en ambientes perturbados (Piletas).

5.5. Conclusiones y consideraciones finales

El análisis Físico-Químico del agua de los sitios estudiados, permitió determinar que las Piletas presentan grandes concentraciones de Iones, muy por encima de los valores permitidos para la conservación de la biota y para el consumo humano. Por otro lado, el agua de los arroyos (CNantes, CNmina, A°V, A°H) presentó menor concentración de iones y no mostraron mayores diferencias en los parámetros Físico-Químicos del agua, por más que estos discurran por diferentes ambientes litológicos.

Para una correcta caracterización de los sitios de estudio, complementariamente a los análisis Físico-Químicos del agua, fue necesario considerar una multiplicidad de

factores bióticos y abióticos, para determinar efectivamente el nivel de perturbación antrópica.

El sitio A°V tiene la mayor diversidad de especies, seguido de las Piletas, que más allá de ser un sitio artificial altamente perturbado, soporta poblaciones adultas relativamente abundantes. Mientras que los arroyos naturales asociados a la mina (CNantes y CNmina) presentan baja riqueza y abundancia de especies.

Los factores que más influyeron en el crecimiento y desarrollo larval son los físico-químicos del agua, principalmente el ion flúor, ya que en la experiencia de microcosmos y en la experiencia *In situ*, la tendencia de los parámetros biológicos fue similar. En el sitio Piletas, la mortalidad fue alta, el reclutamiento bajo y bajas tasas de desarrollo larval. Mientras que en el resto de los sitios no se observaron mayores diferencias en los parámetros biológicos considerados.

La alteración del hábitat por la actividad minera, provocó reajustes en las características de historias de vida en las poblaciones de las dos especies, destacándose un retardo en alcanzar la madurez y una longevidad reducida en las poblaciones provenientes de las Piletas. Las diferencias obtenidas en los rasgos de historias de vida entre los sitios estudiados, pueden explicarse por la reducida longevidad de los individuos y/o por el crecimiento compensatorio, esto último es necesarios para equilibrar los beneficios del rápido crecimiento con los costos que puede tener habitar los sitios altamente perturbados. Esta plasticidad durante la ontogenia puede ser el mecanismo principal por el cual algunas especies pueden prosperar en estos ambientes desfavorables.

Teniendo en cuenta las predicciones establecidas, la veracidad de las mismas fue variable: Respecto de la predicción **P1** (Los cuerpos de agua asociados directamente a la actividad minera presentarán valores de los parámetros físico-químicos del agua que indicarán alta perturbación antrópica) fue verdadera para todos los sitios, reflejando cambios notables en los parámetros físicoquímicos del agua.

La predicción referida al ensamble de anfibios **P2** (Los ensambles de anfibios asociados a ambientes perturbados por la minería se caracterizarán por su bajo número de especies y baja abundancia de individuos con respecto a los ensambles de ambientes no perturbados) por un lado fue falsa, ya que en el sitio artificial (Piletas) que es el más perturbado de los estudiados, la riqueza y diversidad de anfibios fue considerablemente

alta; mientras que por otro lado la predicción fue verdadera, ya que los arroyos naturales asociados directamente a la mina (CNantes y CNmina) poseen bajo número de especies y baja abundancia.

La predicción **P3** (En los sitios asociados directamente a la actividad minera la mortalidad sobre los estadios larvales será mayor, el tiempo de desarrollo y crecimiento a la metamorfosis será mayor y el reclutamiento de metamorfos será menor, que en las poblaciones de los sitios no perturbados por la minería) fue verdadera, teniendo en cuenta los resultados de las dos experiencias realizadas, microcosmos y jaulas de exclusión in situ.

La predicción referida a la demografía de las poblaciones de anfibios en la etapa terrestre **P4** (Las poblaciones de anfibios en ambientes perturbados tendrán una menor edad promedio, un retardo en alcanzar la edad reproductiva y un crecimiento individual reducido con respecto a las poblaciones provenientes de ambientes no perturbados por la actividad minera) fue verdadera, aunque la edad promedio no se diferenció entre sitios como se esperaba. Además, las principales diferencias entre sitios estuvieron relacionadas a las curvas de crecimiento (K y LHCmax) de las poblaciones, resultado no previsto en las predicciones.

Con el análisis de la multiplicidad de parámetros bio-ecológicos expuestos, se pusieron a prueba las hipótesis de estudio, ya que se determinó la afectación del emplazamiento minero Los Cerros Negros. Este efecto resultó ser puntual y limitado casi exclusivamente a las Piletas de decantación. Por otro lado, Los arroyos estudiados, si bien poseen diferente grado de perturbación, no representan en la actualidad riesgo ecológico alguno para la biota regional.

5.6. Recomendaciones

Los arroyos CNantes y CNmina discurren a través del área en donde se realiza la extracción y movimiento de minerales. Estas actividades afectan los márgenes de los arroyos, modifican su caudal y el curso de los mismos. Además corresponden a los sitios donde menos diversidad y abundancia de anfibios se registró. Por lo tanto, sería importante considerar la extracción minera sin afectar éstos parámetros naturales de los cursos de agua regionales, ya que la actividad en esta instancia (extracción, traslado, etc) no necesita estar exclusivamente asociada a los cursos de agua naturales.

En el análisis demográfico de las poblaciones adultas fue fundamental la utilización de dos especies con hábitos reproductivos y ecológicos diferentes, ya que las mismas no respondieron de igual manera a similares perturbaciones. La especie más afectada fue *B. cordobae*. Esta tendencia se reflejó principalmente en la variación de las variables morfométricas, la reducción del SVLmax y la menor PR de sus poblaciones en sitios alterados como las Piletas. Por lo tanto, para estudios futuros, es extremadamente importante conocer la biología de las especies centinelas, debido a que no todas las especies de anfibios podrían responder de la misma manera a perturbaciones similares.

Finalmente, se recomienda continuar el monitoreo del área de extracción minera estudiado, especialmente el arroyo que discurre por el borde norte de las Piletas, porque las sales de sulfatos (SO_4^-) representan uno de los parámetros físicos químicos a monitorear, debido a que esta sal aumenta en los sistemas acuáticos de 30 a 40 veces por encima de los parámetros normales por a la actividad minera, posiblemente por procesos de filtración desde las Piletas hacia los arroyos circundantes. Esta sal (SO_4^-) podría representar un indicador directo de una actividad sustentable de extracción minera.

Los resultados y conclusiones de este trabajo, manifiestan que los sistemas con elevadas concentraciones de iones, principalmente flúor artificial, como las Piletas y/o natural, como el arroyo Cerros Negros en todos sus tramos, cuando se encuentran por encima de los límites sugeridos para la protección de la biota acuática, impactan sobre las poblaciones de anfibios locales. Sin embargo, sería de suma importancia evaluar también el estado poblacional de estas especies, analizando parámetros ecológicos tales como reclutamiento de metamorfoseados, éxito reproductivo, dinámica poblacional, entre otras, permitiendo una visión a largo plazo más integral y holística del estado de conservación de los anfibios anuros que habitan esta región con elevadas concentraciones de flúor.

6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, N.R. (2009). Plasticidad fenotípica en la metamorphosis de larvas de *Rhinella arenarum* del Valle de Lerma, Salta. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Aguilar, C., R. Gamarra, C. Ramirez, J. Suarez, C. Torres, K. Siu-Ting. (2012). Anfibios andinos y estudios de impacto ambiental en concesiones mineras de Perú. *Alytes*, 29, 88-102.
- Alberti, M., Correa, C., Marzluff, J.M., Hendry, A.P., Palkovacs, E.P., Gotanda, K.M., Hunt, V.M., Apgar, T.M., Zhou, Y. (2017). Global urban signatures of phenotypic change in animal and plant populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(34), 8951–8956.
- Alonso, Á., Camargo, J.A. (2011a). Subchronic toxic effects of fluoride ion on the survival and behaviour of the aquatics nail *Potamopyrgus antipodarum* (Hy-drobiidae, Mollusca). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60 (3), 511–517.
- Alonso, Á., Camargo, J.A. (2011b). Toxic effects of fluoride ion on survival, reproduction and behaviour of the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Water Air Soil Pollut.* 219, 81–90.
- Alonso, Á., Camargo, J.A. (2012). A video-based tracking analysis to assess the chronic toxic effects of fluoride ion on the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 81, 70–75.
- Altig, R., McDiarmid, R.W. (2007). Morphological diversity and evolution of egg and clutch structure in amphibians. *Herpetological Monographs*, 21(1), 1-32.
- Altwegg, R. Reyer, H.U. (2003). Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* 57, 872–82.
- Andreazzini, J. (2002). Estudio de Impacto Ambiental en Minería, con énfasis en los Aspectos Geológicos Caso de estudio: mina de fluorita Cerros Negros. Sa. de Comechingones, Cba.”. Tesis de Lic. UNRC.
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Nunes, B., Pereira, R., Gonçalves, F. (2008). In situ bioassay with *Eisenia andrei* to assess oil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 620–631.
- APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington: American Public Health Association.
- Arendt, J.D. (1997). Adaptive intrinsic growth rates: an integration across taxa. *Q. Rev. Biol.* 72, 149-173.
- Attademo, A.M., Bionda, C.D.L., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Seib, S.N., Basso, A., Junges, C.M. (2014). Edad, tamaño corporal en la madurez sexual, longevidad y potencial reproductivo de *Leptodactylus latinasus* y *Leptodactylus mystacinus* en un cultivo de soja y un bosque nativo del centro este de Argentina. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(1), 315-317.
- Autrom, A. (2010). Susceptibilidad diferencial al níquel en distintos estadios del desarrollo embrionario larval de *Rhinella (Bufo) arenarum*. Tesis Doctoral UBA.
- Babini, S.M., Salas, N.E., Bionda, C., Martino, A.L. (2015a). Implicaciones de la urbanización en la presencia, distribución y ecología reproductiva de la fauna de anuros de una ciudad del área central de Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86, 188-95.

- Babini, S.M., Salas, N.E., Bionda, C., Martino, A.L. (2015b). Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 118-125.
- Babini, S.M., Bionda, C., Salas, N.E., Martino, A.L. (2016). Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental monitoring and assessment*, 188(8), 459.
- Babini, S.M. (2017). Aspectos ecológicos y demográficos de la metamorfosis en *Rhinella arenarum* como indicador de impacto ambiental en ecosistemas con perturbación agrícola-ganadera. Tesis de doctoral. UNRC.
- Baldo, E.G., Demange, M., Martino, R.D. (1996). Evolution of the sierras de Córdoba, Argentina. *Tectonophysics*, 267 (1-4), 121-142.
- Baraquet, M. (2012). Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo pulchella (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina. Tesis Doctoral UNRC.
- Barbier O., L. Arreola Mendoza, L.M. Del Razo. (2010). Molecular mechanisms of fluorite toxicity. *Chem-Biol Interact.* 188, 319-333.
- Barbieri, F.D., Del Pino, E.J. (1975). Jelly coats and diffusible factor in anuran fertilization. *Arch Biol (Liege)*, 86, 311-321.
- Barry, M.J. (2011). Effects of copper, zinc and dragon fly kairomone on growth rate and induced morphology of *Bufo arabicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 918–923.
- Beasley, V.R., Levengood, J.M. (2012). Principles of ecotoxicology. In *Veterinary Toxicology (Second Edition)*, pp. 831-855.
- Beebee, T.J.C. (1996). Ecology and conservation of amphibians. In *Conservation biology series*. Chapman y Hall, pp. 214.
- Beebee, T.J.C., R.A. Griffiths. (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology. *Biological Conservation*, 125, 271-285.
- Begon M., J.L. Harper, C.R. Townsend. (1988). Ecología. Omega, Barcelona, España, pp 886.
- Bellwood DR, Hughes TP. 2001. Regional-scale assembly rules and biodiversity of coral reefs. *Science* 292, 532-1534.
- Bernardo, J., Reagan-Wallin, N.L. (2002). Plethodontid salamanders do not conform to “general rules” for ectotherm life histories: insights from allocation models about why simple models do not make accurate predictions. *Oikos*, 97(3), 398-414.
- Berven, K.A., Gill, D.E. (1983). Interpreting geographic variation in life-history traits. *American Zoologist*, 23(1), 85-97.
- Bionda, C., R. Lajmanovich, N. Salas, A. Martino, Di Tada, I. (2011). Reproductive ecology of the common south american toad *Rhinella arenarum* (anura: bufonidae): reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. *Journal of Herpetology*, 45, 261–264.
- Bionda, C.L., Salas, N.E., Caraffa, E., Baraquet, M., Martino, A.L. (2012). On abnormalities recorded in an urban population of *Rhinella arenarum* from Central Argentina. *Herpetology Notes*, 5, 237–241.
- Bionda, C., Kost, S., Salas, N., Lajmanovich, R., Sinsch, U., Martino, A. (2015). Age structure, growth and longevity in the common toad, *Rhinella arenarum*, from Argentina. *Acta Herpetol.* 10, 55-62.

- Biro, P.A., Abrahams, M.V., Post, J.R., Parkinson, E.A. (2006). Behavioural trade-offs between growth and mortality explain evolution of submaximal growth rates. *Journal of Animal Ecology*, 75(5), 1165-1171.
- Blaustein, A.R., Johnson, P.T.J. (2003). The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1(2), 87-94.
- Blaustein, A., B. Han, R. Relyea, P. Johnson, J. Buck, S. Gervasi, 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.
- Blouin, M.S., Brown, S.T. (2000). Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia*, 125(3), 358-361.
- Bonalumi, A., Sfragulla, J., Jerez, D., Bertolino, S., Rial, J.S., Carrizo, E. (2014). Yacimientos de minerales y rocas industriales. In *Relatorio del XIX Congreso Geológico Argentino. Geología y recursos naturales de la Provincia de Córdoba, II* (pp. 983-1024).
- Boone, M.D., Semlitsch, R.D., Fairchild, J.F., Rothermel, B.B. (2004). Effects of an insecticide on amphibians in large-scale experimental ponds. *Ecological Applications*, 14(3), 685-691.
- Bosch, B., Mañas, F., Gorla, N., Aiassa, D. (2011). Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *J Toxicol Environ Health Sci.* 3(6), 154-163.
- Boyd, C. (1984). Water quality management for pond fish culture: developments in aquaculture and fisheries science, volume 9.
- Burton E.C., M.J. Gray, A.C. Schmutzer, D.L. Miller. (2009). Differential responses of postmetamorphic amphibians to cattle grazing in wetlands. *Journal of Wildlife Management* 73, 269-277.
- Cabido, D., M. Cabido, S. M. Garré, J. A. Gorgas, R. Miatello, A. Ravelo, S. Rambaldi, J. L. Tassile. (2003). Regiones Naturales de la Provincia de Córdoba. Serie C. Publicaciones Técnicas. Agencia Córdoba. Dirección de Ambiente, 102 pp.
- Cabrera. (1994). Regiones fitogeográficas Argentinas. Enciclopedia de Agricultura y Jardinería. Tomo II, Fascículo I. Acme, Buenos Aires.
- Cairns Jr, J., Heath, A. G., Parker, B. C. (1975). The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia*, 47(1), 135-171.
- Camargo, J.A. (2003). Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere* 50, 251-264.
- Cañedo Argüelles, M., Kefford, B.J., Piscart, C., Prat, N., Schäfer, R.B., Schulz, C.J. (2013). Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. *Environ. Pollut.* 173, 157–167.
- Cao, J., Chen, J., Wang, J., Jia, R., Xue, W., Luo, Y., Gan, X. (2013). Effects of fluoride on liver apoptosis and Bcl-2, Bax protein expression in freshwater teleost *Cyprinus carpio*. *Chemosphere* 91(8), 1203–1212.
- Capitanelli, R.G. (1979). III. Clima, pp 45-138. En: Geografía Física de la provincia de Córdoba. Vázquez R.A., R.A. Miatello y M.E. Roqué (eds.). Ed. Boldt, Buenos Aires.
- Carey C., Alexander M.A. (2003). Climate change and amphibian declines: Is there a link? *Divers. Distribut.* 9, 111-121.
- Carroll SP, Jrgensen PS, Kinnison MT, Bergstrom CT, Denison RF, Gluckman P, Smith TB, Strauss SY, Tabashnik BE. (2014). Applying evolutionary biology to address global challenges. *Science* 346(6207) 1245993.
- Castillo Morales, G., Rojas Clemente, J.J., Mills, D., Kunoh, H., Keen, N.T., Mayama, S., Chau, C.H., Waller, G.R. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicación (No. 615.907 E59).

- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México, DF (México). IDRC, Ottawa (Canadá). 189 pp.
- Castro, B.B., Guilhermino, L., Ribeiro, R. (2003). In situ bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut.* 125(3), 325–335.
- Cei, J. M. (1980). *Amphibians of Argentina*. Firenze: Monitore Zoologico Italiano. Nuova Serie.
- Collins, S.J., Russell, R.W. (2009). Toxicity of road salt to Nova Scotia amphibians. *Environ. Pollut.* 157(1), 320–324.
- Connon, R.E., Geist, J., Werner, I. (2012). Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors*, 12(9), 12741–12771.
- Cooke, A. S. (1981). Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 25(2), 123–133.
- Corigliano, M. (2008). Índices para evaluar la calidad ambiental en ríos serranos urbanos mediante indicadores. *Rev. UNRC* 28(1-2): 33-54.
- Chai, L., Dong, S., Zhao, H., Deng, H. (2016). Effects of fluoride on development and growth of *Rana chensinensis* embryos and larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 126, 129–137.
- Chambers, D.L. (2011). Increased conductivity affects corticosterone levels and prey consumption in larval amphibians. *Journal of Herpetology* 45 (2), 219-223.
- Christy, M.T., Dickman, C.R. (2002). Effects of salinity on tadpoles of the green and golden bellfrog (*Litoria aurea*). *Amphib.-Reptil.* 23 (1), 1–11.
- Collins C, Kays R. (2011). Causes of mortality in North American populations of large and medium-sized mammals. *Animal Conservation* 14, 474–483.
- Colwell, R.K. (1997). EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9.1.0. User's Guide and application published. On line: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- Coniglio, J. (2006). Evolución petrológica y metalogenética del batolito Cerro Áspero en relación con el ciclo geoquímica endógeno del Flúor, Sierras de Comechingones, Córdoba, Argentina. Tesis doctoral UNRC. 163 p.
- Coniglio JE, D'eramo FJ, Pinotti LP, Demartis M, Agulleiro Insúa LA, Petrelli HA. (2010). Control estructural de las mineralizaciones de fluorita del Batolito Cerro Áspero, Sierras Pampeanas de Córdoba. *Rev Asoc Geol Argent.* 67(4), 507-520.
- Cowell, S.J., Wehrmeyer, W., Argust, P.W., Robertson, J.G.S. (1999). Sustainability and the primary extraction industries: theories and practice. *Resources policy*, 25(4), 277-286.
- Crespi, E.J., Warne, R.W. (2013). Environmental conditions experienced during the tadpole stage alter post-metamorphic glucocorticoid response to stress in an amphibian. *Integrative and Comparative Biology*, 53 (6), 989–1001.
- Da Rocha, C.A.M. (2011). The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tool for xenobiotic exposure risk assessment: a brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to copper sulphate middle. *MiddleEast Journal of Scientific Research*, 8, 23–29.
- Davies, N.B., Halliday, T.R. (1977). Optimal mate selection in the toad *Bufo bufo*. *Nature*, 269(5623), 56.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2012). InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- DI Tada, I. (1999). Patrones de distribución de los anfibios anuros de la provincial de Córdoba. Tesis Doctoral UNC p 155.
- Dimmick, C.R., M.R. Pelton. (1996). Criteria of sex and age. In Bookhout T. A. (ed.). Research and management techniques for wildlife and habitats. Fifth edition Rev. *The Wildlife Society*. Bethesda, Md. pp. 740.
- Djomo, J.E., V. Ferrier, C. Békaert. (2000). Amphibian micronucleus test in vivo (Jaylet Test) to evaluate the genotoxicity of petrochemical wastewaters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65, 168-174.
- Donnelly M.A., Crump M.L. (1998). Potential effects of climate change on two Neotropical amphibian assemblages. *Clim. Change*, 39, 541-561.
- Donnelly, A. M., Guyer, C., Juterbock, J. E., Alford R. (2004). Técnicas para marcar anfibios en Medición y monitoreo de la diversidad biológica: métodos estandarizados para anfibios. (eds.). Washington, Smithsonian Institution Press, pp 269.
- Duellman, W. E., L. Trueb. (1994). Biology of amphibians. John Hopkins University Press, Baltimore, Md.
- Dunson, W.A., Wyman, R.L., Corbett, E.S. (1992). A symposium on amphibian declines and habitat acidification. *Journal of Herpetology*, 26, 349–352.
- Duré M.I., A.I. Kehr, E.F. Schaefer, F. Marangoni. (2008). Diversity of amphibians in rice fields from northeastern Argentina. *Interciencia* 33, 523-527.
- El Khalil, H., O. El Hamiani, G. Bitton, N. Ouazzani, A. Boularbah. (2008). Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: Monitoring metal content and toxicity of soil runoff and groundwater. *Environ Monit Assess*, 136, 147–160.
- Ernst R., M.O. Rödel. (2008). Patterns of community composition in two tropical tree frog assemblages: separating spatial structure and environmental effects in disturbed and undisturbed forests. *Journal of Tropical Ecology* 24, 111-120.
- Feinsinger, P. (2003). El Diseño de estudios de Campo para la Conservación de la Biodiversidad. Editorial FAN. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. ISBN 99905-66-26-7. 155-157.
- Frost, D.R. (2018). Amphibian Species of the World: Upline Reference. Version 6.0 (*Date of acces*). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index/html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Gallardo, J.M. (1987). Anfibios Argentinos. Guía para su identificación. Buenos Aires. AR. Librería Agropecuaria. 1987. Impreso. 98 pag.
- García, G.C., Fontúrbel, F.R. (2003). Propuestas para un desarrollo sostenible: Lago Titikaka por estrategias K. Editorial Publicaciones Integrales. La Paz, pp. 105.
- Gatica, E.A., Almeida, C.A., Mallea, M.A., Del Corigliano, M.C., González, P. (2012). Water quality assessment, by statistical analysis, on rural and urban areas of Chocancharava River (Río Cuarto), Córdoba, Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 184 (12), 7257-7274.
- Gauthier, L., Tardy, E., Mouchet, F., Marty, J. (2004). Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Sci. Total Environ.* 323 (1), 47–61.
- Giménez, L. (2006). Phenotypic links in complex life cycles: conclusions from studies with decapod crustaceans. *Integr. Comp. Biol.* 46, 615–622.
- Gleick, P.H. (1998). Water in crisis: paths to sustainable water use. *Ecological applications*, 8(3), 571-579.

- Goh, E.H., Neff, A.W. (2003). Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. *Food Chem.Toxicol.* 41(11), 1501–1508.
- Gosner, K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16, 183–190.
- Gray, M.J., Smith, L.M., Leyva, R.I. (2004). Influence of agricultural landscape structure on a Southern High Plains, USA, amphibian assemblage. *Landscape Ecology*: 19, 719-729.
- Gualdoni, C.M., Oberto, A.M., Raffaini, G.B. (1994). La aplicación de índices bióticos en la subcuenca del río Chocancharava (Cuarto) (Córdoba, Argentina). *Rev. UNRC*, 14(1), 39–52.
- Guarino, F.M., de Pous, P., Crottini, A., Mezzasalma, M., Andreone, F. (2011). Age structure and growth in a population of *Pelobates varaldii* (Anura, Pelobatidae) from northwestern Morocco. *Amphibia-Reptilia* 32, 550-556.
- Guerry A.D., JR. M.L. Hunter. (2002). Amphibian distribution in a landscape of forest and agriculture: an examination of landscape composition and configuration. *Conservation Biology* 16, 745-754.
- Hamann, M.I., A.I. Kehr, C.E. González. (2006). Species affinity and infracommunity ordination of helminths of *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) in two contrasting environments from northeastern Argentina. *The Journal of Parasitology* 92, 1171-1179.
- Hawkins, A. (2007). Biomonitoring: guide for the use of biological endpoints in monitoring species, habitats, and projects (No. TR-2284-ENV). Commanding Officer-Naval Facilities Engineering Command. Port Hueneme, CA. 147 p.
- Hazell, D., Cunnungam, R., Lindenmayer, D., Mackey, B., Osborne, W. (2001). Use of farm dams as frog habitat in an Australian agricultural landscape: factors affecting species richness and distribution. *Biological Conservation* 102, 155-169.
- Hecnar, S.J. (1995). Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 2131–2137.
- Herkovits, J., C. Perez-Coll, F. Herkovits. (1996). Ecotoxicity in the Reconquista River, Province of Buenos Aires, Argentina: A Preliminary Study. *Environmental Health Perspectives.* 104, 186-189.
- Hermosilla, I.B., Ortega, J.C. (1989). Efecto del Fluor en el desarrollo embrionario del Anuro Chileno *Caudiverbera caudiverbera*: Crecimiento y capacidad de natación. *Bol. Soc. Concepción, Chile* 60, 129-137.
- Hernández, O.D., Castro, F., Paez, M. (2013). Bioacumulación de mercurio en larvas de anuros en la zona afectada por la Minería de Oro en el Río Dagua, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 18(2), 341–348.
- Heyer, W.R. (1974). Niche measurements of frog larvae from a seasonal tropical location in Thailand. *Ecology*, 55(3), 651-656.
- Heyer W., M. Donnelly, R. Mcdiarmid, L. Hayek, M. Foster. (1994). *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians.* (eds.). Washington, Smithsonian Institution Press, pp 364.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton Jr., G.A., Cairns Jr., J. (2003). *Hand book of Eco- toxicology*, 2nd ed. FL: Lewis Publishers, Boca Raton, p. 1290.
- Hua J, Jones DK, Mattes BM, Cothran RD, Relyea RA, Hoverman JT. (2015). Evolved pesticide tolerance in amphibians: predicting mechanisms based on pesticide novelty and mode of action. *Environmental Pollution* 206, 56–63
- Kapelus, P. (2002). Mining, corporate social responsibility and the “Community”: The case of Rio Tinto, Richards Bay Minerals and the Mbonambi. *J. Bus. Ethics* 39 (3), 279–296.

- Kaushal, S.S., Groffman, P.M., Likens, G.E., Belt, K.L., Stack, W.P., Kelly, V.R., Band, L.E., Fisher, G.T. (2005). Increased salinization of fresh water in the northeastern United States. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 13517–13520.
- Keller, A., Rodel, M.O., Linsenmar, K.E., Grafe, T.U. (2009). The importance of environmental heterogeneity for species diversity and assemblage structure in Bornean stream frogs. *Journal of Animal Ecology* 78, 205-3014.
- 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.
- Kraemer, P.E., Escayola, M.P., Martino, R.D. (1995). Hipótesis sobre la evolución tectónica neoproterozoica de las Sierras Pampeanas de Córdoba (30° 40'–32° 40'), Argentina. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 50 (1-4), 47-59.
- Kraus, F. (2009). Alien reptiles and amphibian. A scientific compendium and analysis. *Invading nature: Springer series in invasion ecology 4 USA*.
- Krishnamachari, K.A. (1986). Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease. *Prog Food Nutr Sci*, 10 (3-4), 279-314.
- Kutrup, B., E. Cakir, Z. Colak, Z. Bulbul, H. Karaoglu. (2011). Age and growth of the toad, *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) from an island and a mainland population in Giresun, Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10, 1469-1472.
- Kwet, A., Reichle, S., Silvano, D., Úbeda, C., Baldo, D., di Tada, I. (2004). *Rhinella arenarum*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 April 2015.
- Lajmanovich, R.C., Cabagna-Zenklusen, M.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Bassó, A., Lorenzatti, E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium, *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 769, 7-12.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Junges, C. M., Attademo, A. M., Sanchez, L. C., Basso, A. (2010). Activity levels of Besterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River floodplain: implication for ecological risk assessment of soybean crops. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1517–1524.
- Lanctôt, C.S.D. Melvi, L. Fabbro, F.D.L. Leusch, S.P. Wilson. (2016). Effects of coal mine wastewater on locomotor and non-locomotor activities of empire gudgeons (*Hypseleotris compressa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 127, 36–42.
- Laurila, A., Crochet, P. A., Merilä, J. (2001). Predation-induced effects on hatchling morphology in the common frog (*Rana temporaria*). *Canadian Journal of Zoology*, 79(5), 926-930.
- Lavilla E., M. Ponssa, D. Baldo, N. Bosso, J. Céspedes, J. Chebez, J. Faivovich, L. Ferrari, R. Lajmanovich, J Langone, P. Peltzer, C. Úbeda, M. Vaira, F. Vera Candiotti. (2000). Categorización de los anfibios de Argentina, 11-34. En: Lavilla, E. O., Richard, E., Scrocchi, G. (Eds.) 2000. Categorización de los Anfibios y Reptiles de la República Argentina. Asociación Herpetológica Argentina, Tucumán, Argentina.
- Lescano, J. N., Nori, J., Verga, E., Robino, F., Bonino, A., Miloch, D., ..., Leynaud, G. C. (2015). Anfibios de las Sierras Pampeanas Centrales de Argentina: diversidad y distribución altitudinal. *Cuadernos de herpetología*, 29(2), 103-115.
- Liao, W.B., Liu, W.C., Merilä, J. (2015). Andrew meets Rensch: sexual size dimorphism and the inverse of Rensch's rule in Andrew's toad (*Bufo andrewsi*). *Oecologia* 177, 389–399.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M. (2004). 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a

- specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN).
- Luddecke, H. (2002). Variation and trade-off in reproductive output of the Andean frog *Hyla labialis*. *Oecologia* 130, 403-410.
- Magurran, A.E. (1987). Ecological diversity and its measurements. Princeton, New Jersey, Princeton University Press, pp 179.
- Magurran, A. E. (1988). Why diversity?. In *Ecological diversity and its measurement* (pp. 1-5). Springer Netherlands.
- Magurran, A.E. (2005). Species abundance distributions: pattern or process?. *Functional Ecology*, 19(1), 177-181.
- Maneyro, R., Carreira, S. (2012). Guía De Anfibios Del Uruguay. Ediciones de la Fuga. Montevideo, Uruguay.
- Mangel, M., Munch. S.B. (2005). A life-history perspective on short- and long-term consequences of compensatory growth. *Am. Nat.* 166, 155-176.
- Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environ Pollut.* 157, 2903–2927.
- Marangoni, F., Barrasso, D.A., Cajade, R., Agostini, G. (2012). Body size, age and growth pattern of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) of Argentina. *Northwest. J. Zool.* 8, 63-71.
- Margalef, R. (1983). Limnología. Capt.1. Omega. S.A Barcelona.
- Marques, S.M., Gonçalves, F., Pereira, R. (2008). Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi* Seoane. *Sci.Total Environ.* 402, 29–35.
- Marques, S.M., Antunes, S.C., Pissarra, H., Pereira, M.L., Gonçalves, F., Pereira, R. (2009). Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberiangreen frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. *Aquat. Toxicol.* 91: 187–195.
- Marques, S.M., Chaves, S., Gonçalves, F., Pereira, R. (2013). Evaluation of growth, biochemical and bioaccumulation parameters in *Pelophylax perezi* tadpoles, following an in-situ acute exposure to three different effluent ponds from a uranium mine. *Sci. Total Environ.* 445, 321–328.
- Marquis, O., Millery, A., Guittonneau, S., Miaud, C. (2006). Toxicity of PAHs and jelly protection of eggs in the common frog *Rana temporaria*. *Amphibia-Reptilia*, 27(3), 472-475.
- Mazerolle, M.J. (2003). Detrimental effects of peat mining on amphibian abundance and species richness in bogs. *Biological Conservation*, 113(2), 215-223.
- McMenamin S.K., Hadley E.A., Wright C.K. (2008). Climatic change and wetland desiccation cause amphibian decline in Yellowstone National Park. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 16988-16993.
- Melvin, S.D., Lanctot, C.M., Craig, P.M., Moon, T.W., Peru, K.M., Headley, J.V., Trudeau, V.L. (2013). Effects of naphthenic acid exposure on development and liver metabolic processes in anuran tadpoles. *Environ. Pollut.* 177, 22–27.
- Méndez, M.A., E.R. Soto, C. Correa, A. Veloso, E. Vergara, M. Sallaberry, P. iturra. (2004). Morphological and genetic differentiation among Chilean populations of *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). *Revista Chilena de Historia Naturall* 77, 559-567.
- Metcalf, N.B., Monaghan, P. (2001). Compensation for a bad start: grow now, pay later? – *Trends. Ecol. Evol.* 16, 254–260.
- Miaud, C., Merilä, J. (2001). Local adaptation or environmental induction? Causes of population differentiation in alpine amphibians. *Biota*, 2(1), 31-50.

- Miaud, C., Üzüüm, N., Avci, A., Olgun, K. (2007). Age, size and growth of the endemic Anatolian mountain frog *Rana holtzi* from Turkey. *Herpetol. J.* 17, 167-173.
- Milu, V., J. Leroy, C. Peiffert. (2002). Water contamination downstream from a copper mine in the Apuseni Mountains, Romania. *Environmental Geology* 42, 773–782.
- Miró, R.C. (1999). El basamento Precámbrico-Paleozoico Inferior de las Sierras Pampeanas, Famatina, Cordillera Oriental y Puna. In: Caminos, R. (Ed.), *Geología Argentina*. Instituto de Geología y Recursos Minerales. Anales 29, Buenos Aires, Argentina, pp. 133–167.
- Mittal, M., Flora, S.J. (2006). Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chem. Biol. Interact.* 162, 128–139
- Miyata, K., Ose, K. (2012). Thyroid hormone disrupting effects and the amphibian metamorphosis assay. *Toxicol. Pathol.* 25 (1), 1-9.
- Moreno C. (2002). *Métodos para Medir la Biodiversidad*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Zaragoza, España.
- Muñoz-Escobar, E.M., Palacio-Baena, J.A. (2010). Efectos del cloruro de mercurio (HGCL₂) sobre la supervivencia y crecimiento de renacuajos de *Dendrosophus bogerti*. *Actual Biol.* 32 (93), 189-197.
- Mutti, D., Yakovleva, N., Vazquez-Brust, D., Di Marco, M.H. (2012). Corporate social responsibility in the mining industry: Perspectives from stakeholder groups in Argentina. *Resources Policy*, 37(2), 212-222.
- Newman MC, Clements W. (2008). *Ecotoxicology*. CRC Press, Florida, USA pp 1-10.
- Nogera, M.L. (2015). Actividad minera en el choco biogeografico y su impacto en anfibios. Tesis de licenciatura, Universidad Militar Nueva Granada, Colombia.
- Odum EP. (1971). *Fundamentals of Ecology*. Saunders Company, London, Inglaterra.
- Oggero, A., M. Arana. (2012). Inventario de las plantas vasculares del sur de la zona serrana de Córdoba, Argentina. *Hoehnea*, 39 (2), 171-199.
- Ogle, D. H. (2010). Von Bertalanffy Growth Model Vignette. Disponible en Web (8 de agosto de 2010) <http://www.ncfaculty.net/dogle/fishR/gnrlex/VonBertalanffy/VonBertalanffy.pdf>. Accedido (Julio de 2016).
- Orizaola, G., Dahl, E., Laurila, A. (2010). Compensating for delayed hatching across consecutive life-history stages in an amphibian. *Oikos*, 119(6), 980-987.
- Ortiz, S.G., Acosta, J. C., Murúa, F. (2003). Fauna de vertebrados y actividad minera: estudio de línea de base en la cuenca del río castaño, san juan, argentina. *Multequina* 12, 23-35.
- Otero, M.A., Baraquet, M., Pollo, F.W., Grenat, P.R., Salas, N.E., Martino, A.L. (2017a). Sexual Size Dimorphism in Relation to Age and Growth in *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae) from Córdoba, Argentina. *Herpetol. Conserv. Biol.* 12, 141–148
- Otero, M.A., Valetti, J.A., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L. (2017b). Are ploidy and age size-related? A comparative study on tetraploid *Pleurodema kriegi* and octoploid *P. cordobae* (Anura: Leptodactylidae) from Central Argentina. *Zoologischer Anzeiger* 268, 136-142.
- Othmani, M.A., Souissi, F., da Silva, E.F., Coynel, A. (2015). Accumulation trends of metal contamination in sediments of the former Pb–Zn mining district of Touiref (NW Tunisia). *Journal of African Earth Sciences*, 111, 231-243.
- Orizaola, G., E. Dahl, A. Laurila. (2010). Compensating for delayed hatching across consecutive life-history stages in an amphibian. *Oikos* 119, 980–987.

- Owor, M., T. Hartwig, A. Muwanga, D. Zachmann, W. Pohl. (2007). Impact of tailings from the Kilembe copper mining district on Lake George, Uganda. *Environ. Geol.* 51, 1065–1075.
- Pander, J., Geist, J. (2013). Ecological indicators for stream restoration success. *Ecological Indicators*, 30, 106-118.
- Parris K.M. (2004). Environmental and spatial variables influence the composition of frog assemblages in sub-tropical eastern Australia. *Ecography* 27, 392-400.
- Partridge L, Harvey P.H. (1988). The ecological context of life history evolution. *Science* 241, 1449–1455.
- Pavignano, I. (1988). A multivariate analysis of habitat determinants for *Triturus vulgaris* and *T. carnifex* in northwestern Italy. *Alytes* 7, 265-272.
- Pearman, P.B. (1977). Correlates of amphibian diversity in an altered landscape of Amazonian Ecuador. *Conservation Biology* 11, 1211-1225.
- Pechmann, J.H.K., Scott, D.E., Gibbons, J.W., Semlitsch, R.D. (1989). Influence of wetland hydroperiod on diversity and abundance of metamorphosing juvenile amphibians. *Wetl. Ecol. Manag.* 1, 3–11.
- Pechenik, J.A. (2006). Larval experience and latent effects – metamorphosis is not a new beginning. *Integr. Comp. Biol.* 46, 323–333.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C. (2001). Habitat fragmentation and amphibian species richness in riparian areas of the Parana River, Argentina. *Froglog*, 46, 5.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Beltzer, A.H. (2003). The effects of habitat fragmentation on amphibian species richness in the floodplain of the Middle Parana River, Argentina. *Herpetological Journal*, 13(2), 95-98.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Beltzer, A.H. (2006). Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. *Biodiversity & Conservation*, 15(11), 3499-3513.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Sánchez-Hernandez, J.C., Cabagna, M.C., Attademo, A.M., Bassó, A. (2008). Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(1), 185-197.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Cabagna-Zenklusen, M.C., Repetti, M.R., Sigrist, M.E., Beldoménico, H. (2013). Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined tree frog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 142–151.
- Piper, A.M. (1953). *A graphic procedure in the geochemical interpretation of water analysis* (No. 12). US Department of the Interior, Geological Survey, Water Resources Division, Ground Water Branch.
- Plötner, J. Matschke, J. (2012). Akut-toxische, subletale und indirekte Wirkungen von Glyphosat und glyphosathaltigen Herbiziden auf Amphibien-eine Übersicht. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 19(1), 1-20.
- Pollo, F., Grenat, P., Otero, M., Salas, N., Martino. (2016). Health status of tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) that inhabit aquatic ecosystems associated to fluorite mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 466-474.
- Polo Cavia, N., Engstrom, T., López, P., Martín, J. (2010). Body condition does not predict immune competence of western pond turtles in altered versus natural habitats. *Anim. Conserv.* 13(3), 256–264.
- Pough, F.H., Wilson, R.E. (1977). Acid precipitation and reproductive success of *Ambystoma* salamanders. *Water, Air, and Soil Pollution*, 7(3), 307-316.

- Prado, O.A. (2005). Situación y perspectivas de la minería metálica en Argentina (Vol. 91). United Nations Publications.
- Rac, M., Safranow, K., Jakubowska, K., Chlubek, D., Machoy, Z. (2005). Adenine nucleotides in snail muscles as one of biomarkers of fluoride toxicity. *J. Environ. Monit.* 7(6), 631–634.
- Ramos, V.A. (1999). Rasgos estructurales del territorio Argentino. I. Evolución tectónica de la Argentina. In: Caminos, R. (Ed.), *Geología Argentina*. Instituto de Geología y Recursos Minerales. Anales 29, Buenos Aires, Argentina, pp. 715–786.
- Rapport, D.J., Regier, H.A., Hutchinson, T.C. (1985). Ecosystem behavior under stress. *American naturalist*, 617-640.
- Rivas-Torres A., Sanmartín-Villar I., Gabela-Flores M.V., Cordero-Rivera A. (2017). Demographics and behaviour of *Heteragrion cooki*, a forest damselfly endemic to Ecuador (Odonata). *International Journal of Odonatology* 20, 123–135.
- Rosso, J., M. Puntoriero, J. Troncoso, A. Volpedo, A. Fernández Cirelli. (2011). Occurrence of Fluoride in Arsenic-Rich Surface Waters: A Case Study in the Pampa Plain, Argentina. *Bull. Environ Contam Toxicol* 87, 409-413.
- Rowe, L., Ludwig, D. (1991). Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology*, 72(2), 413-427.
- Rozenblut, B., Ogielska, M. (2005). Development and growth of long bones in European water frogs (Amphibia: Anura: Ranidae), with remarks on age determination. *J. Morphol.* 265, 304-317.
- Sanabria, E.A., Quiroga, L.B., Acosta, J.C. (2007). Sitios de oviposición y esfuerzo reproductivo en *Chaunus arenarum* (Anura: Bufonidae) en el desierto del Monte, Argentina. *Revista Española de Herpetología* 21, 49-53.
- Sánchez-Vélez, A., García-Núñez, R. M. (1999). Biomonitoring of rivers in the management of basins; A preliminary introduction. In *IX Congreso Nacional de Irrigación, Simposio* (Vol. 4, pp. 63-71).
- Sanzo, D., Hecnar, S.J. (2006). Effects of road de-icing salt (NaCl) on larval wood frogs (*Rana sylvatica*). *Environ. Pollut.* 140(2), 247–256.
- Schaefer, E.F. (2006). Restricciones cuantitativas asociadas con los modos reproductivos de los anfibios en áreas de impacto por la actividad arrocerá en la provincia de Corrientes. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.
- Semlitsch, R.D., Scott, D.E., Pechmann, J.H.K. (1988). Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 69 (1), 184–192.
- Schmutzer, A. C., Gray, M. J., Burton, E. C., Miller, D. L. (2008). Impacts of cattle on amphibian larvae and the aquatic environment. *Freshwater Biology* 53, 2613–2625.
- Seppä, P., Laurila, A. (1999). Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity*, 82 (3), 309-317.
- Sharma, B., Patiño, R. (2009). Effects of cadmium on growth, metamorphosis and gonadal sex differentiation in tadpoles of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Chemosphere* 76, 1048–1055.
- Sinsch, U. (1990). Migration and orientation in anuran amphibians. *Ethology Ecology & Evolution* 2(1), 65-69.
- Sinsch, U., I.E., Di Tada, A.L. Martino. (2001). Longevity, Demography and Sex-Specific Growth of the Pampa de Achala Toad, *Bufo achalensis* CEI, 1972. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 36, 95-104.

- Sinsch, U., A.L. Martino, I.E. Di Tada. (2002). Skeletochronological assessment of age growth in neotropical lizard *Pristidactylus ahalensis* (Iguanidae). *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, 89 (1), 329.
- Sinsch, U., Oromi, N., Sanuy, D. (2007). Growth marks in Natterjack Toad (*Bufo calamita*) bones: histological correlates of hibernation and aestivation periods. *Herpetol. J.* 17, 129-137.
- Sinsch, U. (2015). Skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. *Herpetol. J.* 25, 5–13.
- Spear P.A., M. Boily, I. Giroux, C. Deblois, M.H. Leclair, M. Levasseur, R. Leclair. (2009). Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquatic Toxicology*, 91, 110-117.
- Stearns SC. (1992). *The evolution of life stories*. Oxford: Oxford University Press.
- Stuart, S., J. Chanson, N. Cox, B. Young, A. Rodrigues, D. Fischman, R. Waller. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions. *Worldwide Science*, 306: 1783-1786.
- Tejedo, M., Fieques, R. (2003). Evaluación de los efectos del vertido tóxico de las minas de Aznalcóllar sobre la comunidad de anfibios del Río Guadiamar. En *Ciencia y Restauración del río Guadiamar*. Consejería de Medio Ambiente.
- Teplitsky, C., Plénet, S., Joly, P. (2003). Tadpoles responses to risk of fish introduction. *Oecologia* 134, 270–277.
- Tilt, C. A., Symes, C. F. (1999). Environmental disclosure by Australian mining companies: environmental conscience or commercial reality?. In *Accounting Forum* 23(2), 137-154).
- Üzümlü, N., Olgun, K. (2009). Age and growth of the southern crested newt, *Triturus karelinii* (Strauch 1870), in a lowland population from northwest Turkey. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 55, 55-65.
- Van Buskirk, J., Saxer, G. (2001). Delayed costs of an induced defense in tadpoles? Morphology, hopping, and development rate at metamorphosis. *Evolution* 55, 821-829.
- Vasconcelos, T.S., T.G. Santos, D.C. Rossa Feres, C.F.B Haddad. (2009). Influence of the environmental heterogeneity of breeding ponds on anuran assemblages from southeastern Brazil. *Canadian Journal of Zoology* 87, 699-707.
- Villalba, G., M. Blarasin, J. Coniglio. (2000). Características Geohidrológicas de la cuenca Del Arroyo El Talita, Batolito Cerro Áspero, Córdoba, Argentina. *1st Joint World Congress on Grounwater*. 21 p.
- Von Bertalanffy, L. (1938). A quantitative theory of organic growth. *Hum. Biol.* 10, 181-213.
- Weddelling, K., G. Bosbach, M. Hachtel, U. Sander, P. Schmidt, D. Tarkhnishvili. (2005). Egg size versus clutch size: variation and trade-off in reproductive output of *Rana dalmatina* and *R. temporaria* in a pond near bonn (germany). *Herpetologia Petropolitana*, Ananjeva N. and Tsinenko O. (eds.), 238-240.
- Welsh H., L. Ollivier. (1998). Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's redwoods. *Ecological Applications*. 8, 1118-1132.
- Werner, E.E. (1986). Amphibian metamorphosis: growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *Am. Nat.* 128, 319–341.
- Werner, E.E., Glennemeier, K. (1999). The influence of forest canopy cover on the breeding pond distributions of several amphibian species. *Copeia*, 1, 1–12.
- Wilbur, H.M., Collins, J.P. (1973). Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182, 1305–1314.

- Wood, S. L., Richardson, J. S. (2009). Impact of sediment and nutrient inputs on growth and survival of tadpoles of the western toad. *Freshwater Biology* 54(5), 1120–1134.
- Yakovleva, N., Vazquez-Brust, D., Mutti, D. (2010). Corporate social responsibility of mining companies in Argentina. Greening of Industry Network Conference, Seoul, South Korea, 13–16 July 2010.
- Yan, X., Yan, X., Morrison, A., Han, T., Chen, Q., Li, J., Wang, J. (2010). Fluoride induces apoptosis and alters collagen I expression in rat osteoblasts. *Toxicol. Lett.* 200, 133–138.
- Young, B.E., S.N. Stuart, J.S. Chanson, N.A. Cox, T.M. Boucher. (2004). Joyas que están desapareciendo: El estado de los anfibios en el nuevo mundo. Nature Serve, Arlington, Virginia, pp. 53.
- Zamora-Camacho, F.J., Comas, M. (2017). Greater reproductive investment, but shorter lifespan, in agrosystem than in natural-habitat toads. *PeerJ* 5, e3791.
- Zhao, H., Chai, L., Wang, H. (2013). Effects of fluoride on metamorphosis, thyroid and skeletal development in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Ecotoxicology* 22 (7), 1123–1132.
- Zhelev, Z., Arnaudov, A., Boyadzhiev, P. (2014). Colour polymorphism, sex ratio and age structure in the populations of *Pelophylax ridibundus* and *Pseudepidalea viridis* (Amphibia: Anura) from anthropogenically polluted biotopes in southern Bulgaria and their usage as bioindicators. *Trak. J. Sci.* 1, 1–12.
- Zimmerman, B.L. (1994). Audio Strip Transects. En: Heyer, W.R., Donnelly M.A., McDiarmid, R. W., Hayek, L. C., Foster, M. S. (eds.): Measuring and Monitoring Biological Diversity, Standard Methods for Amphibians, Smithsonian Institution Press, Washington DC. Pp

APENDICE I - Cuadros comparativos resumen de la morfometría y parámetros de historia de vida de *R. arenarum* y *B. cordobae* para cada sitio de estudio.

Características morfológicas de los adultos de *R. arenarum* y *B. cordobae* para cada sitio. Se muestran promedios \pm desvíos estándar y rangos (en paréntesis).

	Variables	CNantes		CNmina		Piletas		A°V		A°H	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<i>Rhinella arenarum</i>	<i>n</i>	-	-	21	14	42	8	10	17	-	-
	LHC (mm)	-	-	88,62 \pm 8,63 (74,4-105,3)	94,04 \pm 6,23 (85,78-106,8)	93,34 \pm 5,8 (78,83-104,1)	101,2 \pm 3,4 (96-109,6)	89,6 \pm 14 (62,1-102,3)	95,43 \pm 13,6 (60,1-117,3)	-	-
	Peso (g)	-	-	74,12 \pm 11,5 (48,5-90)	91,25 \pm 20,6 (57,9-119)	97,84 \pm 16,3 (78-132,6)	108,4 \pm 13,1 (93-122,8)	85,2 \pm 14,9 (60,8-101,9)	89,49 \pm 30,9 (42-144,5)	-	-
	Condición corporal	-	-	0,113 \pm 0,33 (0,07-0,18)	0,101 \pm 0,016 (0,087-0,137)	0,122 \pm 0,027 (0,088-0,186)	0,099 \pm 0,013 (0,08-0,115)	0,145 \pm 0,45 (0,098-0,204)	0,105 \pm 0,032 (0,065-0,166)	-	-
<i>Boana cordobae</i>	<i>n</i>	15	-	-	-	32	11	14	20	31	14
	LHC (mm)	51,01 \pm 3,9 (42-55,37)	-	-	-	47,84 \pm 3,24 (43,26-54)	52,26 \pm 2,6 (49,5-55)	48,7 \pm 4,39 (41-58,26)	52,78 \pm 5,03 (42-60)	43,89 \pm 3,70 (39,8-51,5)	45,27 \pm 6,81 (39-52)
	Peso (g)	8,9 \pm 1,64 (6,2-12)	-	-	-	9,95 \pm 2,18 (7-15,5)	12,71 \pm 2,13 (9,6-16,1)	8,75 \pm 1,86 (6,3-13,6)	11,73 \pm 3,33 (7,5-17,3)	7,39 \pm 1,59 (6,3-11,2)	10,00 \pm 3,93 (8,4-15,1)
	Condición corporal	0,068 \pm 0,012 (0,05-0,094)	-	-	-	0,09 \pm 0,011 (0,063-0,111)	0,089 \pm 0,011 (0,07-0,104)	0,085 \pm 0,016 (0,051-0,109)	0,083 \pm 0,017 (0,064-0,121)	0,09 \pm 0,016 (0,061-0,121)	0,10 \pm 0,017 (0,075-0,124)

Sitios resaltados en celeste; arroyos que discurren sobre roca granítica con diferente grado de alteración minera. En verde se resalta el sitio artificial (Piletas) con elevado grado de alteración antrópica. Sitios resaltados en naranja; arroyos que discurren sobre roca metamórfica con baja alteración antrópica.

Parámetros de historia de vida de *R. areanrum* y *B. cordobae* para cada sitio de estudio. Se muestran la edad media; Edad modal de la muestra; Edad a la madurez sexual (EMS); Largo hocico cloaca a la madurez sexual (LHC a EMS); Longevidad en años; Potencial reproductivo (PR); Tasa de crecimiento (K) y tamaño máximo (LHCmax) estimado por los modelos de von Bertalanffy.

	Variables	CNantes		CNmina		Piletas		A°V		A°H	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<i>Rhinella arenarum</i>	<i>n</i>	-	-	18	13	26	8	9	14	-	-
	Edad media	-	-	3,11±0,71 (2-4)	3,08±0,79 (2-4)	3,37±0,83 (3-5)	3,4±0,55 (3-4)	3,2±0,84 (2-4)	3,08±0,98 (2-5)	-	-
	Edad modal	-	-	3 (50%)	3 (41,6%)	3 (52,63%)	3 (60%)	3 (40%)	2 (38,46%)	-	-
	EMS	-	-	2	2	3	3	2	2	-	-
	LHC a EMS	-	-	78,37±4,25	88,17±8,17	83,15±3,36	98,06±4,82	75,12	84,17±6,31	-	-
	Longevidad	-	-	4	4	5	4	4	5	-	-
	PR	-	-	3	3	3	2	3	4	-	-
	K	-	-	0,7±0,11 (0,49-0,92)	0,76±0,11 (0,53-0,96)	0,77±0,10 (0,55-0,97)	0,42±0,12 (0,18-0,69)	0,39±0,06 (0,27-0,5)	0,4±0,06 (0,26-0,51)	-	-
	LHC max	-	-	101,6±4,95 (91,3-113)	105,8±4,08 (97-114)	102±3,42 (94,8-109,1)	135,8±13,6 (95,7-160)	125,5±7,95 (104,4-145)	135,5±10,7 (113-156,1)	-	-
<i>Boana cordobae</i>	<i>n</i>	14	-	-	-	25	9	12	17	23	14
	Edad media	3,73±0,65 (3-5)	-	-	-	3,4±0,58 (3-5)	3,43±0,53 (3-4)	3,55±0,63 (2-5)	3,85±0,73 (2-5)	2,81±0,61 (2-4)	3,32±0,99 (2-5)
	Edad modal	4 (54,54%)	-	-	-	3 (64%)	3 (57,14%)	3 (47,5%)	3 (38,46%)	3 (35%)	3 (50,5%)
	EMS	3	-	-	-	3	3	2	2	2	2
	LHC a EMS	46,38±3,79	-	-	-	47,04±1,97	51,20±2,53	49,13±3,39	54,90±2,96	42,86±0,91	46,57±4,34
	Longevidad	5	-	-	-	5	4	5	5	4	5
	PR	3	-	-	-	3	2	4	4	3	4
	K	0,45±0,19 (0,09-0,88)	-	-	-	0,45±0,13 (0,19-0,78)	0,47±0,16 (0,04-0,86)	0,32±0,07 (0,24-0,4)	0,28±0,08 (0,12-0,46)	0,25±0,088 (0,19-0,30)	0,29±0,062 (0,22-0,33)
	LHC max	57,7±7,1 (48,8-60,7)	-	-	-	51,2±6,3 (40-58,2)	58,6±7,08 (45,3-67,3)	63,2±4,12 (54,8-70,1)	65,8±5,79 (50,5-76)	66,2±5,28 (61,1-71,5)	64,3±6,44 (54,4-69,4)

Sitios resaltados en celeste; arroyos que discurren sobre roca granítica con diferente grado de alteración minera. En verde se resalta el sitio artificial (Piletas) con elevado grado de alteración antrópica. Sitios resaltados en naranja; arroyos que discurren sobre roca metamórfica con baja alteración antrópica.

APÉNDICE II – Copia de publicaciones derivadas de la tesis

SEXUAL SIZE DIMORPHISM IN RELATION TO AGE AND GROWTH IN *HYPYSIBOAS CORDOBAE* (ANURA: HYLIDAE) FROM CÓRDOBA, ARGENTINA

MANUEL OTERO^{1,2,3}, MARIANA BARAQUET^{1,2}, FAVIO POLLO^{1,2}, PABLO GRENAT^{1,2},
NANCY SALAS¹, AND ADOLFO MARTINO¹

¹*Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional N° 36-km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Argentina*

²*National Council for Scientific and Technical Research CONICET Fellowships*

³*Corresponding author; e-mail:manuelalejandrootero@gmail.com*

Abstract.—Most anurans exhibit sexual size dimorphism (SSD). This morphological variation between the sexes may be attributed to different ages at maturity, growth rate, or longevity. We present the first data on age structure and growth pattern of *Hypsiboas cordobae* using skeletochronology, and analyze SSD considering age-specific differences in body size based on 71 individuals. Snout-vent length (SVL) and body mass (BM) were significantly different between the sexes. Females were larger and heavier than males, but mean age between adult males and females was not significantly different. Minimum age at sexual maturity, longevity, and potential reproductive lifespan did not differ between the sexes. Female SVL and BM at sexual maturity were significantly larger than those of males. ANCOVA revealed significant sexual differences in body size and weight. The sexual dimorphism index in body size was 0.0679 (SVL) and 0.3621 (BM). Growth curves using the von Bertalanffy model showed a similar profile in both sexes, but the growth coefficient was higher in males. Age determination and the von Bertalanffy growth model for *H. cordobae* allowed us to determine SSD and our results may provide baseline data on the demography of *H. cordobae*.

Key Words.—age distribution; demography; longevity; skeletochronology; sexual selection

INTRODUCTION

Sexual size dimorphism (SSD) is a difference in body length or mass of sexually mature organisms and has been demonstrated in a variety of animals (Kupfer 2007). Differences in body size or shape between sexes within a population might be produced under sexual selection (Shine 1988) or from ecological differences between sexes (Slatkin 1984; Shine 1989). Amphibians are often sexually dimorphic in body size and shape, color, morphology, ornaments, and physiological characteristics (Kupfer 2007; Bell and Zamudio 2012). Several hypotheses aim to explain the existence of SSD in amphibian species. Male-biased SSD is promoted when males are territorial and involved in male-male combat (Tsuji and Matsui 2002; Kupfer 2007; Liao et al. 2015). Female-biased SSD is promoted by fecundity selection and high male mortality rates (Shine 1988; Liao et al. 2015). SSD is a widespread phenomenon in numerous anuran species in which females (Reinhard et al. 2015) or males (Taborsky et al. 2009) have a larger body size than the opposite sex. This variation can also be attributed to different age at maturity, growth rate, or longevity (Üzüm and Olgun 2009; Sinsch et al. 2010;

Casale et al. 2011); therefore, consideration of these factors is essential in the study of anuran SSD.

Determining the age of individual amphibians provides crucial information on demographic parameters, such as longevity, growth rate, and size at sexual maturity of a population (Duellman and Trueb 1994). Also, skeletochronology is considered a reliable method for age estimation and growth rates of many vertebrates, including amphibians (Sinsch et al. 2001; Marangoni et al. 2012). This method is based on the observation of annual growth rings of bones (commonly known as lines of arrested growth, LAGs). These rings are formed during hibernation and reflect the seasonal changes in growth rate (Smirina 1994; Bionda et al. 2015). However, age estimation may be underestimated or overestimated if a correct interpretation of LAGs is not performed (Sinsch 2015).

The genus *Hypsiboas* contains 93 species, most of them included in seven species groups (Frost, D.R. 2016. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.0. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. [Accessed 26 August 2016]). The *Hypsiboas pulchellus* group currently has 37 species (Faivovich et al. 2005;

Köhler et al. 2010; Batista et al. 2015), including *H. cordobae* (Barrio 1965). This species is distributed in the hills of Córdoba and San Luis provinces, Argentina (Barrio 1965; Baraquet et al. 2015). Available literature about *H. cordobae* is mainly related to cytogenetics (Barale et al. 1991; Baraquet et al. 2013b), bioacoustics (Baraquet et al. 2013c, 2015), and hematology (Baraquet et al. 2013a, 2014).

Although morphometric analyses for *H. cordobae* were performed by Cei (1980) and Baraquet et al. (2012), none of these studies considered age-related differences in body size. The aim of this study is to present the first data on the growth pattern, age at maturity, and longevity of *H. cordobae*. Furthermore, we determine whether SSD, considering age-related differences in body size, exists in *H. cordobae*, and evaluate it in relation to demographic parameters.

MATERIALS AND METHODS

Study area.—Sampling site was located in central part of the Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina (32°50'34"S, 64°79'30"W, 1,200 m elevation). This region is characterized by a semi-humid to semi-dry climate with a deficit of water in the winter. This area is enclosed within the 19° C isotherm. Mean annual rainfall is approximately 901 mm (Oggero and Arana 2012).

Field data collection.—We collected 71 *H. cordobae* September 2013 to March 2014 (10 froglets, one juvenile, 39 adult males, and 21 adult females). We hand-captured individuals during surveys on the shores of streams and ponds, and newly metamorphosed froglets with tails not completely reabsorbed while emerging from ponds. We determined the sex of adults using external secondary sexual characters (black vocal sacs in males, and eggs readily visible through the abdomen wall in females). We measured the snout-vent length (SVL) of each individual using a digital caliper (0.01 mm) and body mass (BM) using a digital balance (0.01 g). We clipped the longest right phalanx of each frog and preserved it in 70% ethanol. We released all individuals at their capture site.

Age determination.—We performed laboratory protocols following standard skeletochronology methods (Bionda et al. 2015; Otero et al. in press): (1) fixation in 4% formalin (at least 12 h), (2) decalcification of bones (5–10%) formic acid (24 h), (3) paraffin embedding, (4) cross sectioning of the diaphysis at 10–12 μ m using a rotary microtome, (5) staining with Ehrlich's haematoxylin (3 min), (6) light microscopic count of the number of lines of arrested

growth (LAG) at 100 \times , and (7) documenting the most informative cross sections with photographs taken with a digital camera. We identified and interpreted LAGs following Sinsch (2015) for neotropical species, and LAGs were independently counted by two researchers. We identified double and false lines following Sinsch et al. (2007), and we assessed endosteal resorption by observing the presence of the Kastschenko line (KL; the interface between the endosteal and periosteal zones; Rozenblut and Ogielska 2005). Furthermore, we assessed the complete resorption of the innermost LAG by comparing the diameter of the smallest juvenile cross-section with the diameter of the resorption line of adults (Li et al. 2013). We estimated demographic variables following Bionda et al. (2015) and Otero et al. (in press): (1) age at maturity: the minimum number of LAGs counted in breeding individuals; (2) longevity: the maximum number of LAGs counted in reproductive individuals; (3) potential reproductive lifespan: the difference between longevity and age at maturity; (4) size at maturity: the average SVL of all first-time breeding adults with the minimum number of LAGs; and (5) modal lifespan: mode of age distribution.

We constructed a growth model following the von Bertalanffy (1938) equation, previously used in several studies of amphibians (Cogălniceanu and Miaud 2002; Guarino et al. 2011; Bionda et al. 2015). We used the following equation: $SVL_t = SVL_{max} - (SVL_{max} - SVL_{met}) e^{-K(t-t_{met})}$, where SVL_t = average SVL at age t , SVL_{max} = maximum (asymptotic) SVL, SVL_{met} = average SVL at metamorphosis, t = number of growing seasons experienced (age), t_{met} = age at metamorphosis, fixed to 0.4, and K = growth coefficient (shape of the growth curve). In the von Bertalanffy growth model, body length is considered as a function of age, and we fit length to the average growth curve using the least squares procedure.

Data analysis.—We used parametric tests when the data met the assumptions (normality and homogeneity of variance) and non-parametric Kruskal-Wallis tests otherwise. We used an analysis of covariance (ANCOVA) with age as a covariate to compare SVL and BM between sexes. Pearson's correlation coefficient was computed to assess the relationships between SVL-BM and age. We also estimated SSD using the Lovich and Gibbons (1992) sexual dimorphism index (SDI): $SDI = (\text{size of larger sex} / \text{size of smaller sex}) \pm 1$; +1 if males are larger or -1 if females are larger, and the result arbitrarily defined as positive when females are larger than males and negative in the contrary. We performed all tests using the Statistica 6.0/W software package (Statsoft Inc., USA) with $P \leq 0.05$ considered significant.

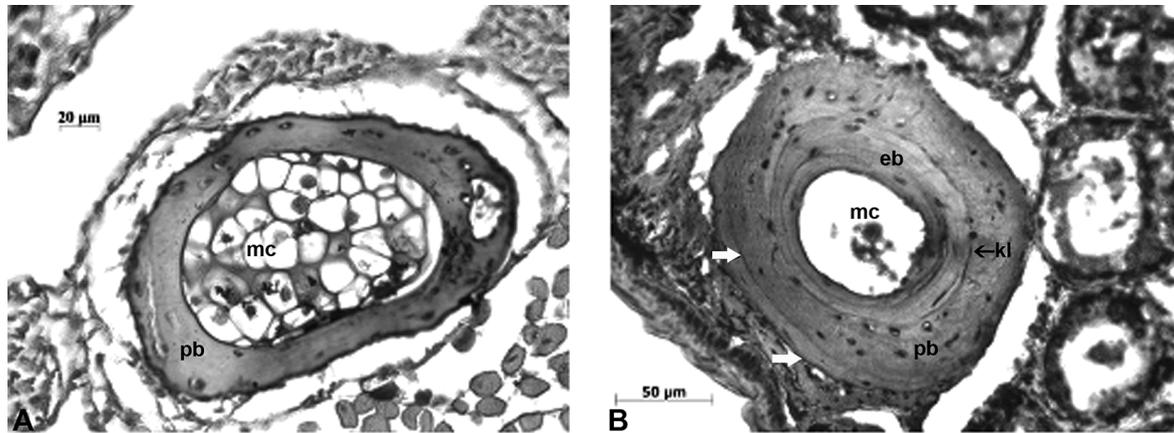


FIGURE 1. Examples of phalangeal cross-sections (10 μ m thick) of *Hypsiboas cordobae* (mc = medullar cavity; pb = periosteal bone; eb = endosteal bone; kl = Kastschenko line). (A) Newly metamorphosed individual (SVL = 31.9) without lines of arrested growth (LAGs), and (B) male; SVL: 45.1 mm; 2 LAGs (white arrows).

RESULTS

Bone histology.—All individuals studied showed recognizable bone structures that allowed age determination. In newly metamorphosed individuals, sections had a large medullar cavity and no LAGs (Fig. 1A). In adults, well-defined LAGs were found in the periosteal bone (Fig. 1B). Endosteal resorption was present in 24 individuals (39% of the total) and well-defined Kastschenko lines were easily observed, but the resorption did not hamper age determination because the first LAG was never completely reabsorbed (Fig. 1B). In many cases, the outer most lines were closely adjacent, but at the insertion site of the phalangeal ligament, it was possible to discern the peripheral LAGs and to reliably count them. We observed double LAGs and false LAGs in two males and one female, and we account for these in age estimation.

Body length, weight and age.—Female SVL averaged $51.27 \pm$ (SD) 5.06 mm and was significantly larger than male SVL, which averaged 48.01 ± 4.9 mm ($F_{1,58} = 5.85$, $P = 0.018$). Average female weight (12.3 ± 2.53 g) was also significantly greater than in males (9.03 ± 2.44 g; $F_{1,58} = 24.81$, $P < 0.001$). Mean age was not significantly different between adult males and females ($H = 1.32$, $P = 0.205$; Table 1).

Life-history traits of *H. cordobae* showed little variation between sexes (Table 2). We found no sexual differences in longevity. Modal age was similar between sexes; 3 y in both males (58.9%) and females (47.3%). Potential reproductive lifespan was similar between sexes. Minimum age at sexual maturity was close to 2 y in both sexes, and minimum SVL at sexual maturity was 38.9 mm in males and 41.35 mm in females (Fig. 2). Mean SVL at sexual maturity was slightly larger in females than in males, but this difference was not statistically significant ($H = 2.82$, $P = 0.092$); whereas, weight at sexual maturity was significantly greater in females than in males ($H = 4.53$, $P = 0.044$).

Sexual size dimorphism.—SVL and BM were significantly and positively correlated with age in both sexes (SVL males: $n = 39$, $r = 0.36$, $P \leq 0.05$; SVL females: $n = 21$, $r = 0.78$, $P \leq 0.05$; BM males: $n = 39$, $r = 0.39$, $P \leq 0.05$; BM females: $n = 21$, $r = 0.68$, $P \leq 0.05$). When the effect of age was controlled, SVL differed significantly between sexes ($F_{1,57} = 25.41$, $P < 0.001$) as did BM ($F_{1,57} = 26.07$, $P < 0.001$). However, in both sexes, variation in SVL and BM at comparable ages were large; consequently, we observed large overlaps between body size and weight of individuals from different age classes. The sexual dimorphism index (SDI) in body size was 0.0679 for SVL and 0.3621 for

TABLE 1. Snout-vent length (SVL), weight, and age of *Hypsiboas cordobae* collected south of the Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina. Mean values \pm SE and ranges (in parentheses) are given.

Parameters	Tadpoles (n = 10)	Juvenile (n = 1)	Males (n = 39)	Females (n = 21)
SVL (mm)	28.94 ± 1.93 (25.8–31.9)	35.1	48.01 ± 4.99 (38–56.26)	51.27 ± 5.06 (41.15–58)
Weight (g)	1.91 ± 0.32 (1.38–2.35)	4.01	9.03 ± 2.44 (4.5–15.1)	12.3 ± 2.53 (8.2–17.4)
Age (years)	0.4	1	3.18 ± 0.64 (2–5)	3.47 ± 0.87 (2–5)

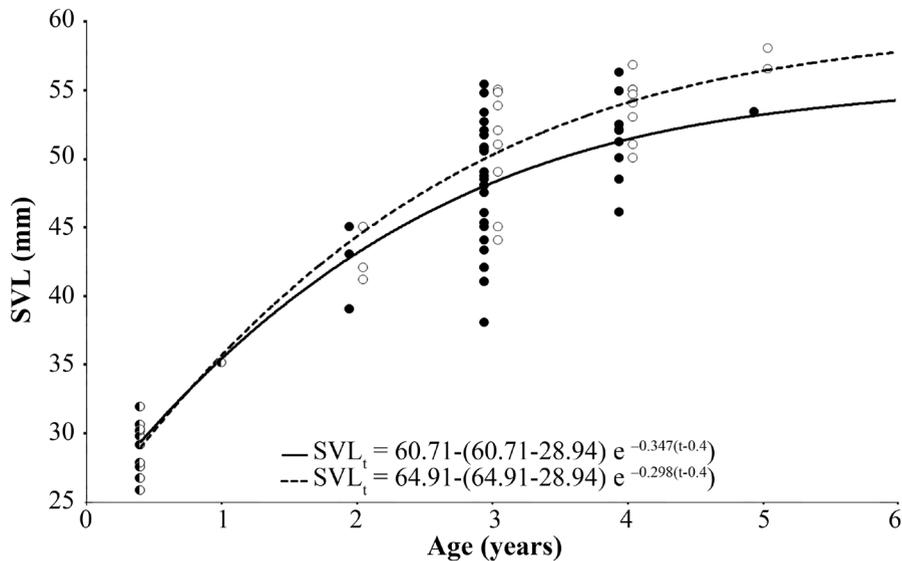


FIGURE 2. Relationship between body length (SVL) and age classes in *Hypsiboas cordobae*. Lines represent the von Bertalanffy’s growth model; males: solid line; females: dotted line.

BM. Variation in SDI (age class/SDI) was: 2/0.0293, 3/0.0634, 4/0.0427, 5/0.0721 for SVL, and 2/0.3136, 3/0.3059, 4/0.4294, 5/0.0357 for BM. Females had larger average SVL and BM than males in all age classes.

The von Bertalanffy growth model adequately fitted the age/body-length data with $r^2 = 0.832$ in males and $r^2 = 0.939$ in females. Growth models showed a similar shape in males and females (Fig. 2), but the growth coefficient was slightly higher in males than in females ($K \pm CI$, males: 0.347 ± 0.093 ; females: 0.298 ± 0.078). We observed a decrease in growth rate for both sexes from the 2nd to the 3rd year, which follows sexual maturity. The estimated asymptotic SVL for both sexes (males: 60.71 ± 4.64 mm; females: 64.91 ± 5.81 mm) was larger than the maximum SVL recorded in this study.

DISCUSSION

This is the first study to use skeletochronology to estimate the age and demographic parameters to corroborate SSD in *H. cordobae*. Formation of LAGs is genetically controlled based on a circannual rhythm (Marangoni et al. 2012; Sinsch 2015). The formation of bone growth layers of *H. cordobae* may be associated with the marked seasonality of the temperate region. In these regions, the length of the cold period has been

identified as one of the most important variables in differentiating growth patterns (Caetano and Castanet 1993). The validity of these patterns has been confirmed in several species: European Common Toads (*Bufo bufo*; Hemelaar 1981), Natterjack Toad (*Bufo calamita*; Sinsch et al. 2007), European Tree Frog (*Hyla arborea*; Ozdemir et al. 2012), and South American Common Toads (*Rhinella arenarum*; Bionda et al. 2015).

The histo-morphological structure of the diaphysis of *H. cordobae* phalange was relatively uniform, with a parallel-fibered bone matrix. Stained lines of arrested growth (LAGs) were clearly visible between zones of thicker layers of bone deposited during growth periods (Miaud et al. 2007). Several studies have demonstrated that bone resorption never, or only partially, reaches the innermost LAG (Sinsch et al. 2001; Iturra-Cid et al. 2010). These observations are consistent with our observations of Kastschenko lines in the bones of *H. cordobae*. We occasionally observed double and false lines, but they were unclear or incomplete and distinguishable from the LAGs. The age of individuals was more accurately estimated by considering bone resorption in cross sections of phalanges and detection of false LAGs.

We found a positive significant correlation between body size (SVL-BM) and age for both sexes. This observation, explained by the indeterminate growth

TABLE 2. Demographic life history traits of *Hypsiboas cordobae* collected south of the Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina. Mean \pm SE and ranges (in parentheses) are given. Abbreviations are n = sample size, A = age mode (frequency); AM = age at sexual maturity (years); L = longevity (years); PRLS = potential reproductive lifespan (years).

Sex	n	A	AM	L	PRLS	SVL at AM	Weight (g) at AM
Male	39	3 (58.9%)	2	5	3	41.5 ± 2.8 (38.9–44.6)	6.8 ± 1.71 (5.1–8.9)
Female	21	3 (47.3%)	2	5	3	43.42 ± 1.9 (41.35–45)	8.9 ± 0.81 (8–9.6)

typical of ectothermic animals, confirms the results of multiple studies (Kyriakopoulou-Sklavounou and Grumiro 2002; Özdemir et al. 2012; Cajade et al. 2013). The results of our study confirmed sexual size dimorphism on both SVL and BM for *H. cordobae*, with females being, on average, larger and heavier than males in all age classes, in concordance with other hylid species (Özdemir et al. 2012; Cajade et al. 2013). Many amphibians display sexual size dimorphism (Shine 1979; Monnet and Cherry 2002; Li et al. 2010), mostly because natural selection favors large females when female body length is positively correlated with fecundity (Gibbons and McCarthy 1986; Shine 1988; Liao et al. 2015). A positive correlation between body length and fecundity has been well documented in anurans (Davies and Halliday 1977; Liao et al. 2015), presumably because females need more stored energy to increase egg production, either to produce larger eggs, or to lay more eggs (Shine 1979; Halliday and Verrell 1988).

In many amphibian species, males reach sexual maturity one year earlier than females (Kyriakopoulou-Sklavounou and Grumiro 2002; Liao et al. 2010). However, age at sexual maturity was estimated at two years for both males and females *H. cordobae*. In this species, SVL did not differ significantly between sexes at sexual maturity, although the SVL in older individuals was significantly different between sexes, with females being larger. Therefore, greater length in adult females does not appear to be caused by either different growth rates in pre-reproductive age or to delayed sexual maturity in females, both patterns observed in several species of frogs (Liao and Lu 2010; Liao and Lu 2012).

Differential mortality between sexes has been reported for frogs, in which males have higher mortality than females possibly for being more active during the breeding season (Shirose et al. 1993; Kyriakopoulou-Sklavounou et al. 2008). However, in *H. cordobae*, both longevity and age structure were similar between sexes. Our results indicate that females are not larger than males when they reach sexual maturity, but that females grow larger than males after they are sexually mature, when more resources are allocated to reproduction (Halliday and Verrell 1988). Therefore, a reproductive behavior that is energetically costly for older males (Woolbright 1989) and females devoting more energy to somatic growth, could produce the sexual size dimorphism in *H. cordobae*.

Our von Bertalanffy growth models showed few differences in growth rates of immature *H. cordobae*, whereas, the growth curves distinctly diverge between sexes from three years of age onwards. Sexual size dimorphism may depend on the relative importance of age and growth rate parameters in the sexes (Özdemir et al. 2012; Liao et al. 2013). In *H. cordobae*, although

females showed a slow arrival at the estimated maximum SVL (as indicated by the lower K) they exhibited a greater average and post-maturity growth rate. Therefore, growth rate and growth duration were the main contributors to sexual size dimorphism.

In conclusion, age assessment and subsequent modeling of data using the von Bertalanffy growth model allowed us to determine SSD in *H. cordobae*, with females being larger and heavier than males. Sexual dimorphism in body size and shape are apparently related to continuous growth of females after sexual maturity; thus, females reach larger body sizes and increase their reproductive output and clutch size. Our results indicate the importance of age determination for morphometric studies involving intersex comparisons. In addition, our study provides baseline data on the demography of *H. cordobae* for use in future conservation studies, because it can be used to estimate basic ecological parameters of a population.

Acknowledgments.—We thank the Secretary of Research and Technology of National University of Río Cuarto (PPI 18/C416) and National Agency for Scientific and Technological Promotion FONCYT (BID-PICT 0932-2012) for provided funds. All authors thank CONICET - Argentina (Argentinean National Research Council for Science and Technology) for fellowships granted. Our study was authorized by Cordoba Environmental Agency (A.C.A.S.E.), Environmental Secretary of Córdoba Government, and the Ethical Committee of Investigation of the National University of Río Cuarto (file number 38/11). We are thankful to Joshua Taylor for help with correcting the English.

LITERATURE CITED

- Barale, G.D., I.E. di Tada, and J.A. Lisanti. 1991. Descripción del cariotipo y ubicación del organizador nucleolar en *Hyla pulchella cordobae* (Anura, Hylidae) de la Pampa de Achala. *Revista Universidad Nacional de Río Cuarto* 11:31–34.
- Baraquet, M., P.R. Grenat, N.E. Salas, and A.L. Martino. 2012. Variación morfométrica y geográfica entre poblaciones de *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae) en Argentina. *Cuadernos de Investigación UNED* 4:147–155.
- Baraquet, M., P.R. Grenat, N.E. Salas, and A.L. Martino. 2013a. Intraspecific variation in erythrocyte sizes among populations of *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae). *Acta Herpetologica* 8:93–97.
- Baraquet, M., P.R. Grenat, N.E. Salas, and A.L. Martino. 2015. Geographic variation in the advertisement call of *Hypsiboas cordobae* (Anura, Hylidae). *Acta Ethologica* 18:79–86.

- Baraquet, M., N.E. Salas, and A.L. Martino. 2013b. C-banding patterns and meiotic behavior in *Hypsiboas pulchellus* and *H. cordobae* (Anura, Hylidae). *Journal of Basic and Applied Genetics* 24:32–39.
- Baraquet, M., N.E. Salas, and A.L. Martino. 2013c. Advertisement calls and interspecific variation in *Hypsiboas cordobae* and *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) from central Argentina. *Acta Zoologica Bulgarica* 65:479–486.
- Baraquet, M., N.E. Salas, and A.L. Martino. 2014. Variation in the erythrocyte size among larvae, juveniles and adults of *Hypsiboas cordobae* (Anura, Hylidae). *Basic and Applied Herpetology* 28:137–143.
- Barrio, A. 1965. Las subespecies de *Hyla pulchella* Duméril & Bibron (Anura, Hylidae). *Physis* 69:115–128.
- Batista, V.G., P.G. Gambale, R. Lourenço de Moraes, R.M. Campos, and R.P. Bastos. 2015. Vocalizations of two species of the *Hypsiboas pulchellus* group (Anura: Hylidae) with comments on this species group. *North-Western Journal of Zoology* 11:253–261.
- Bell, R.C., and K.R. Zamudio. 2012. Sexual dichromatism in frogs: natural selection, sexual selection and unexpected diversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279:4687–4693.
- Bionda, C., S. Kost, N. Salas, R. Lajmanovich, U. Sinsch, and A. Martino. 2015. Age structure, growth and longevity in the common toad, *Rhinella arenarum*, from Argentina. *Acta Herpetologica* 10:55–62.
- Caetano, M.H., and J. Castanet. 1993. Variability and microevolutionary patterns in *Triturus marmoratus* from Portugal: age, size, longevity and individual growth. *Amphibia-Reptilia* 14:117–129.
- Cajade, R., F. Marangoni, and E. Gangenova. 2013. Age, body size and growth pattern of *Argenteohyla siemersi pedersenii* (Anura: Hylidae) in northeastern Argentina. *Journal of Natural History* 47:237–251.
- Casale, P., N. Conte, D. Freggi, C. Cioni, and R. Argano. 2011. Age and growth determination by skeletochronology in Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) from the Mediterranean Sea. *Scientia Marina* 75:197–203.
- Cei, J.M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano (Nuova Serie)*, Monographs, Firenze, Italy.
- Cogălniceanu, D., and C. Miaud. 2002. Age, survival and growth in *Triturus dobrogicus* (Amphibia, Urodela) from the lower Danube floodplain. *International Association for Danube Research* 34:777–783.
- Davies, N.B., and T.R. Halliday. 1977. Optimal mate selection in the toad *Bufo bufo*. *Nature (London)* 269:56–58.
- Duellman, W.E., and L. Trueb. 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA.
- Faivovich, J., C.F.B. Haddad, P.C.A. Garcia, D.R. Frost, J.A. Campbell, and W.C. Wheeler. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294:1–240.
- Gibbons, M.M., and T.K. McCarthy. 1986. The reproductive output of frogs *Rana temporaria* (L.) with particular reference to body size and age. *Journal of Zoology* 209:579–593.
- Guarino, F.M., P. de Pous, A. Crottini, M. Mezzasalma, and F. Andreone. 2011. Age structure and growth in a population of *Pelobates varaldii* (Anura, Pelobatidae) from northwestern Morocco. *Amphibia-Reptilia* 32:550–556.
- Halliday, T.R., and P.A. Verrell. 1988. Body size and age in amphibians and reptiles. *Journal of Herpetology* 22:253–265.
- Hemelaar, A.S.M. 1981. Age determination of male *Bufo bufo* (Amphibia, Anura) from the Netherlands based on year rings in phalanges. *Amphibia-Reptilia* 3:223–233.
- Iturra-Cid, M., J.C. Ortiz, and N.R. Ibarguengoytia. 2010. Age, size, and growth of the Chilean frog *Pleurodema thaul* (Anura: Leiuperidae): latitudinal and altitudinal effects. *Copeia* 2010:609–617.
- Köhler, J., D. Koscinski, J.M. Padial, J.C. Chaparro, P. Handford, S.C. Loughheed, and I. De la Riva. 2010. Systematics of Andean gladiator frogs of the *Hypsiboas pulchellus* species group (Anura, Hylidae). *Zoologica Scripta* 39:572–590.
- Kupfer, A. 2007. Sexual size dimorphism in amphibians: an overview. Pp.50–59 *In* Sex, Size, and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism. Fairbairn, D.J., W.U. Blanckenhorn, and T. Székely (Eds.). Oxford University Press, New York, New York, USA.
- Kyriakopoulou-Sklavounou, P., and I. Grumiro. 2002. Body size and age assessment among breeding populations of the tree frog *Hyla arborea* in northern Greece. *Amphibia-Reptilia* 23:219–224.
- Kyriakopoulou-Sklavounou, P., P. Stylianou, and A. Tsiora. 2008. A skeletochronological study of age, growth and longevity in a population of the frog *Rana ridibunda* from southern Europe. *Zoology* 111:3–36.
- Li, C., W.B. Liao, Z.S. Yang, and C.Q. Zhou. 2010. A skeletochronological estimation of age structure in a population of the Guenther's Frog, *Hylarana guentheri*, from western China. *Acta Herpetologica* 5:1–11.
- Li, S.T., X. Wu, D.Y. Li, S.L. Lou, Z.P. Mi, and W.B. Liao. 2013. Body size variation of Odorous Frog

- (*Odorrana grahami*) across altitudinal gradients. *Herpetological Journal* 23:187–192.
- Liao, W.B., and X. Lu. 2010. Age structure and body size of the Chuanxi Tree Frog *Hyla annectans chuanxiensis* from two different elevations in Sichuan (China). *Zoologischer Anzeiger* 248:255–263.
- Liao, W.B., and X. Lu. 2012. Adult body size = f (initial size + growth rate × age): explaining the proximate cause of Bergman’s cline in a toad along altitudinal gradients. *Evolutionary Ecology* 26:579–590.
- Liao, W.B., W.C. Liu, and J. Merilä. 2015. Andrew meets Rensch: sexual size dimorphism and the inverse of Rensch’s rule in Andrew’s Toad (*Bufo andrewsi*). *Oecologia* 177:389–399.
- Liao, W.B., Y. Zeng, C.Q. Zhou, and R. Jehle. 2013. Sexual size dimorphism in anurans fails to obey Rensch’s rule. *Frontiers in Zoology* 10:1–7.
- Liao, W.B., C.Q. Zhou, Z.S. Yang, J.C. Hu, and X. Lu. 2010. Age, size and growth in two populations of the Dark Spotted Frog *Rana nigromaculata* at different altitudes in southwestern China. *Herpetological Journal* 20:77–82.
- Lovich, J.E., and J.W. Gibbons. 1992. A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. *Growth, Development and Aging* 56:269–281.
- Marangoni, F., Barrasso, D.A., Cajade, R., and G. Agostini. 2012. Body size, age and growth pattern of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) of Argentina. *North-Western Journal of Zoology* 8:63–71.
- Miaud, C., N. Üzümlü, A. Avcı, and K. Olgun. 2007. Age, size and growth of the endemic Anatolian Mountain Frog *Rana holtzi* from Turkey. *Herpetological Journal* 17:167–173.
- Monnet, M.J., and M.I. Cherry. 2002. Sexual size dimorphism in anurans. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 269:2301–2307.
- Oggero, A.J., and M.D. Arana. 2012. Inventario de las plantas vasculares del sur de la zona serrana de Córdoba, Argentina. *Hoehnea* 39:171–199.
- Otero, M.A., J.A. Valetti, C.L. Bionda, N.E. Salas, and A.L. Martino. In press. Are ploidy and age size-related? A comparative study on tetraploid *Pleurodema kriegi* and octoploid *P. cordobae* (Anura: Leptodactylidae) from Central Argentina. *Zoologischer Anzeiger* DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jcz.2016.07.005>.
- Özdemir, N., A. Altunışık, T. Ergül, S. Gül, M. Tosunoglu, G. Cadeddu, and C. Giacomina. 2012. Variation in body size and age structure among three Turkish populations of the treefrog *Hyla arborea*. *Amphibia-Reptilia* 33:25–35.
- Reinhard, S., R. Rennera, and A. Kupfer. 2015. Sexual dimorphism and age of Mediterranean salamanders. *Zoology* 118:19–26.
- Rozenblut, B., and M. Ogielska. 2005. Development and growth of long bones in European water frogs (Amphibia: Anura: Ranidae), with remarks on age determination. *Journal of Morphology* 265:304–317.
- Shine, R. 1979. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia* 1979:297–306.
- Shine, R. 1988. The evolution of large body size in females. A critique of Darwin’s fecundity advantage model. *The American Naturalist* 131:124–131.
- Shine, R. 1989. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. *Quarterly Review of Biology* 64:419–461.
- Shirose, L.J., R.J. Brooks, J.R. Barta, and S.S. Desser. 1993. Intersexual differences in growth, mortality and size at maturity in Bullfrogs in central Ontario. *Canadian Journal of Zoology* 71:2363–2369.
- Sinsch, U. 2015. Skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. *Herpetological Journal* 25:5–13.
- Sinsch, U., I.E. di Tada, and A.L. Martino. 2001. Longevity, demography and sex-specific growth of the Pampa de Achala Toad, *Bufo achalensis* CEI, 1972. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 36:95–104.
- Sinsch, U., F. Marangoni, N. Oromi, C. Leskovar, D. Sanuy, and M. Tejedo. 2010. Proximate mechanisms determining size variability in Natterjack Toads. *Journal of Zoology* 281:272–281.
- Sinsch, U., N. Oromi, and D. Sanuy. 2007. Growth marks in Natterjack Toad (*Bufo calamita*) bones: histological correlates of hibernation and aestivation periods. *Herpetological Journal* 17:129–137.
- Slatkin, M. 1984. Ecological causes of sexual dimorphism. *Evolution* 38:622–630.
- Smirina, M.E. 1994. Age determination and longevity in amphibians. *Gerontology* 40:133–146.
- Taborsky, B., L. Guyer, and M. Taborsky. 2009. Size-assortative mating in the absence of mate choice. *Animal Behaviour* 77:439–448.
- Tsuji, H., and M. Matsui. 2002. Male-male combat and head morphology in a Fanged Frog (*Rana kuhlii*) from Taiwan. *Journal of Herpetology* 36:520–526.
- Üzümlü, N., and K. Olgun. 2009. Age and growth of the Southern Crested Newt, *Triturus karelinii* (Strauch 1870), in a lowland population from northwest Turkey. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 55:55–65.
- von Bertalanffy, L. 1938. A quantitative theory of organic growth. *Human Biology* 10:181–213.
- Woolbright, L.L. 1989. Sexual dimorphism in *Eleutherodactylus coqui*: selection pressures and growth rates. *Herpetologica* 45:68–74.



MANUEL OTERO has a Licenciante in Biology from the National University of Río Cuarto (UNRC), Argentina. He is a Doctoral Student in Biological Sciences at the UNRC, with the support of the National Council for Scientific and Technical Research (CONICET). His experience is in demographic, ecological, and biochemical responses of anurans in modified environments in Central Argentina. (Photographed by Pablo Grenat).



MARIANA BARAQUET has a Licenciante in Biology from the National University of Río Cuarto (UNRC), Argentina. She has a Doctorate in Biological Sciences from the UNRC, with the support of National Council for Scientific and Technical Research (CONICET). Currently, she is an Assistant Researcher at the National Research Council of Argentina (CONICET). Her experience is in bioecology, bioacoustics, and skeletochronology of anurans in Central Argentina. (Photographed by Manuel Otero).



FAVIO POLLO has a Licenciante in Biology from the National University of Río Cuarto (UNRC), Argentina. He is a Doctoral Student in Biological Sciences at the UNRC, with the support of the National Council for Scientific and Technical Research (CONICET). His experience includes hematological and biochemical responses of anurans in modified environments in Central Argentina. (Photographed by Manuel Otero).



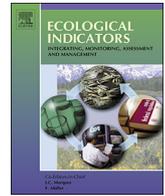
PABLO GRENAT has a Licenciante in Biology and a Doctorate in Biological Sciences from the National University of Río Cuarto (UNRC), Argentina. Currently, he is an Assistant Researcher at the National Research Council of Argentina (CONICET). He is a Professor at the UNRC. His experience is in bioecology, ethology, and bioacoustics of anurans in Central Argentina. (Photographed by Manuel Otero).



NANCY SALAS has a Licenciante in Biology and a Doctorate in Biological Sciences from the National University of Río Cuarto (UNRC), Argentina. She is an Investigator and works in the ecology section within the Department of Natural Science at UNRC. (Photographed by Manuel Otero).



ADOLFO MARTINO has a Licenciante in Biology and a Doctorate in Biological Sciences from the National University of Río Cuarto (UNRC), Argentina. He is a Senior Investigator and works in the ecology section within the Department of Natural Science at UNRC. He is also an Associate Professor at the UNRC. His experience is in bioecology and in bioacoustics of anurans in Central Argentina. (Photographed by Favio Pollo).



Original Articles

Differential effects on life history traits and body size of two anuran species inhabiting an environment related to fluorite mine

Manuel A. Otero^{a,b,*}, Favio E. Pollo^{a,b}, Pablo R. Grenat^{a,b}, Nancy E. Salas^a, Adolfo L. Martino^a

^a Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC, ruta 36 km 601, Rio Cuarto, Córdoba, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Mining
Anurans
Indicators
Life history traits
Environment

ABSTRACT

Mining activity is an important cause of physicochemical, biological, and landscape alterations. Several studies involving disturbed environments confirmed the modification of demographic traits in anuran populations. The current study aimed to assess the effects of natural and artificial surface waters associated with a fluorite mine on the body size and life history traits of *Rhinella arenarum* and *Boana cordobae*. Sampling was done in three areas: stream running on granitic rock, with medium natural fluoride content (CN); stream running on metamorphic rock, with low natural fluoride content (LV); and artificial decantation pond (DP) with large variation in physicochemical parameters. Adult individuals of the two anuran species were measured and weighed, and their body condition (BC) was calculated. Life history traits were assessed using the skeletochronology method. Individuals from DP weighed significantly heavier than individuals from streams. The BC index in *R. arenarum* was higher at LV, whereas in *B. cordobae*, a higher index was obtained at both LV and DP. The average age differs between sites in *B. cordobae* but not in *R. arenarum*. Growth coefficient was higher for altered environment in both species (CN; DP), whereas the estimated SVLmax was slightly higher in populations from less disturbed sites (LV). The most affected species was *B. cordobae*. Therefore, for future studies, it is important to know the biology of sentinel species because not all amphibian species may respond in the same way to similar disturbances. Differences obtained in life history traits may be explained by the lack of survival of larger/older individuals or compensatory growth, required to balance fast growth with the costs on survival at more disturbed sites.

1. Introduction

Pollution of freshwater bodies generates a growing concern worldwide (Antunes et al., 2007; Marques et al., 2008). Anthropogenic activities such as urbanization, agriculture, livestock, and mining activities (Castro et al., 2003; Marques et al., 2008; Antunes et al., 2008; Bionda et al., 2011, 2013; Babini et al., 2015) contribute to such degradation. Mining activity represents one of the main sources of physicochemical, biological, and landscape alterations. Wastewater produced by this activity contains complex mixtures of pollutants (Marques et al., 2009; Zocche et al., 2013; Lanctôt et al., 2016), thereby raising possible threats to aquatic biota. Traditionally, evaluation of environmental health has been based on physicochemical measurements of water bodies, but does not necessarily provide appropriate information on exposure and response of organisms to pollution (Antunes et al., 2008; Lavoie et al., 2012).

It is well noted that anuran amphibians have large potential as bioindicators. Because they have a semipermeable skin and different

life cycle stages, amphibians are susceptible to environmental alteration in both aquatic and terrestrial habitats (Alford and Richards, 1999; Simon et al., 2011; Babini et al., 2015). Amphibians may hold both the role of prey and predators, making up a fundamental element in accumulation and transfer of pollutant substances between aquatic and terrestrial environments (Marques et al., 2013). Furthermore, amphibians are good models for pollution studies because their populations generally contain elevated number of individuals and they are good representatives of aquatic environments (Burger and Snodgrass, 1998). Finally, anuran species-specific characteristics, depending on whether they belong to terrestrial, aquatic, or arboreal habitats, could exhibit greater or lesser negative effects on populations when an environmental change occurs (Keller et al., 2009).

Many studies have demonstrated the adverse effects of wastewater generated by mining activities on amphibians. The main contributions to this knowledge base have been studies under laboratory conditions related to survival, growth, larval development (Tejedo and Fieques, 2003; Muñoz-Escobar and Palacio-Baena, 2010; Lanctôt et al., 2016),

* Corresponding author at: Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC, ruta 36 km 601, Rio Cuarto, Córdoba, Argentina.

E-mail address: motero@exa.unrc.edu.ar (M.A. Otero).

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.065>

Received 22 February 2018; Received in revised form 24 April 2018; Accepted 25 April 2018
1470-160X/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

genotoxicity and cytotoxicity (Djomo et al., 2000; Marques et al., 2008, 2009, 2013). In addition, there are some fieldworks in which the species diversity (Ortiz et al., 2003; Aguilar et al., 2012), *in situ* cytogenotoxicity (Pollo et al., 2016, 2017), sex ratio, and age structure (Zhelev et al., 2014) were evaluated. However, the number of field studies that provide adequate and long-term information on exposure and response of amphibians to mining pollution is low.

The age structure may affect population growth and supply information on recent history, current state, and the future population trends (Dimmick and Pelton, 1996). Moreover, it is could be very appropriate for understanding species dynamics and for establishing reasons of population instability (Driscoll, 1999). In consequence, skeletochronology is considered a reliable technique for age determination of many vertebrates including amphibians (Sinsch et al., 2001; Marangoni et al., 2012; Otero et al., 2017a, 2017b). Several studies from disturbed agroecosystems (Spear et al., 2009; Attademo et al., 2014; Zamora-Camacho and Comas, 2017; Zhelev et al., 2017) and environments affected by coal and copper mining activity (Zhelev et al., 2014) confirmed the modification of demographic traits and body size in anuran populations. However, to date, the effect that fluorite mining could have on life history traits of anuran species is yet unknown.

In this study, we present the first data of demographic and morphometric traits of two anuran species inhabiting an environment associated with fluorite mine. We aim to assess the potential effects of natural and artificial surface waters associated with a fluorite mine on life history traits and body size of *Rhinella arenarum* and *Boana cordobae* to test two exclusive hypothesis: H1: The alteration of an environment related to fluorite mine causes readjustments in anuran life history traits such as changes in growth rates, lower longevity, and reduced reproductive potential (RP); and H2: *R. arenarum* and *B. cordobae* show differential effects on life history traits to similar disturbances because these species have different reproductive and behavioral habits.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The study area is located in the batholith Cerro Áspero (32° 50' 22.85" S; 64° 79'40.60" W; altitude 1200 m.a.s.l.), in the south-central Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina. In this point, rocks contain approximately 1.210 mg/kg of fluoride (Coniglio et al., 2010). This geological formation allowed installation of the fluorite mine Cerros Negros, in which fluoride extraction is carried openwork and fluoride is recovered physically by a flotation process. The mine wastes are deposited on a series of artificial earth ponds, of which two are vegetated with *Typha* sp. In these decantation ponds (DP), precipitate sediments are produced by the fluorite flotation process, and the DP are a closed system.

The landscape corresponds to a mountain environment with low level of anthropic intervention, strongly undulating, with natural vegetation typical of a xerophilous forest (Oggero and Arana, 2012). Several streams cross this area, the most important being the Cerros Negros stream, running on granitic rock (fluoride concentration = 1.90 mg/L), and Los Vallecitos stream, running on metamorphic rock (fluoride concentration = 0.3 mg/L; Pollo et al., 2017). Thus, we selected three sampling sites according to fluoride concentrations and level of disturbance produced by mining activity (Fig. 1): Site I – Vallecitos stream (LV), which runs on metamorphic rock with low natural fluoride content and low levels of mining perturbation (scrap yard); Site II – Cerros Negros stream (CN), which runs on granitic rock with medium natural fluoride content and medium levels of anthropic alteration (soil movement and mineral extraction); and Site III – Artificial DP as areas with high fluoride content and high levels of disturbance (mineral treatment, sediments produced by fluorite flotation process and heavy machinery). In all study sites, population of *R. arenarum* and *B. cordobae* were previously registered.

2.2. Species

R. arenarum has a large distribution in South America and is located in Argentina, Bolivia, Brazil, Uruguay, and Paraguay. Adult individuals generally congregate in large breeding groups at lentic and lotic water bodies. Eggs are landed in large gelatinous strings along the edges of ponds (Kehr, 1994; Bionda et al., 2011). *R. arenarum* inhabits a wide range of environments including coastal areas, subtropical or tropical forests, and rural or urban areas. It is considered as a domestic species owing to their frequent presence in the surroundings of houses. This species represent a useful experimental model for monitoring aquatic environment (Vera Candioti et al., 2010; Pollo et al., 2015, 2017), and its sensitivity has been assessed in several studies (Venturino et al., 2003; Bosch et al., 2011; Lajmanovich et al., 2014; Pollo et al., 2015).

B. cordobae has a distribution limited to San Luis and Córdoba provinces, in central Argentina. This narrow distribution and a broad altitudinal range, together with the reported IUCN status (i.e., data deficient), make this species an interesting research model. *B. cordobae* inhabits highland streams and rivers, usually associated with slight perturbation. Individuals vocalize mainly from periaquatic vegetation but can also do it partly submerged in water (Barrio, 1962). Females deposit egg masses that are stick to submerged vegetation (Verga et al., 2012).

These species present ecological features that are necessary for the selection of sentinel species to ensure the detection of local perturbations: presence in abundance within the study area, low rate of migration, and limited to a small space (Flickinger and Nichols, 1990). In addition, it is well-known that amphibians are highly philopatric; hence, the adult individuals analyzed at each site probably have gone through their larval cycle at that site (Sinsch, 1990). Both species were characterized with regard to their vertical location using Vallan's (2000) guild criteria: *R. arenarum* was found on the ground (terrestrial) and *B. cordobae* was found inhabiting herbaceous, shrubby, or arboreal habitats (arboreal).

2.3. Sampling methods and data collection

We sampled all three sites from September 2013 to April 2014, which is the period of increased reproductive activity for *R. arenarum* and *B. cordobae* and, consequently, when anurans are found around water bodies (Bionda et al., 2011). These months coincide with a season of rainfall and warmer temperatures. In each study site, metamorphosed (n = 5), juveniles (n = 3), and adult individuals of *R. arenarum* (LV = 21; CN = 28; DP = 27) and *B. cordobae* (LV = 54; CN = 14; DP = 34) were found through visual encounter surveys (Heyer et al., 1994) and captured by hand. During the night sampling, the location of the populations was based on male mating calls; consequently, the number of males captured was greater than that of females. After the capture, each individual was anesthetized for few minutes with an MS 222 (Tricaine methanesulfonate) solution. For each captured individual, we recorded snout-vent length (SVL) through a digital caliper Mahr 16 (0.01 mm), weight using a Mettler balance (P11N 0.1–1000 g), and sex according to secondary sexual features such as the presence of vocal sac and nuptial pads (Duellman and Trueb, 1994). One phalanx of each specimen was clipped off following an identification pattern for each site (according to Donnelly et al., 1994), and it was preserved in a solution of 70% alcohol. Antifungal or antibacterial and healing agents were added at the puncture site to prevent infections, and each individual was released 2 h later into their places of capture. The body condition (BC) of all individuals was calculated according to Luddecke (2002) as $\text{weight (g)} \times 1000 / \text{SVL}^3 \text{ (mm)}$, which relates weight and SVL and gives an estimate of the nutritional condition.

In each study site, surface water samples were collected in 1-L plastic bottles for chemical analysis. The major ions (F^- , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , Cl^- , $\text{SO}_4^{=}$, and HCO_3^-) were analyzed by Department of Geology, National University of Río Cuarto, through standard methods

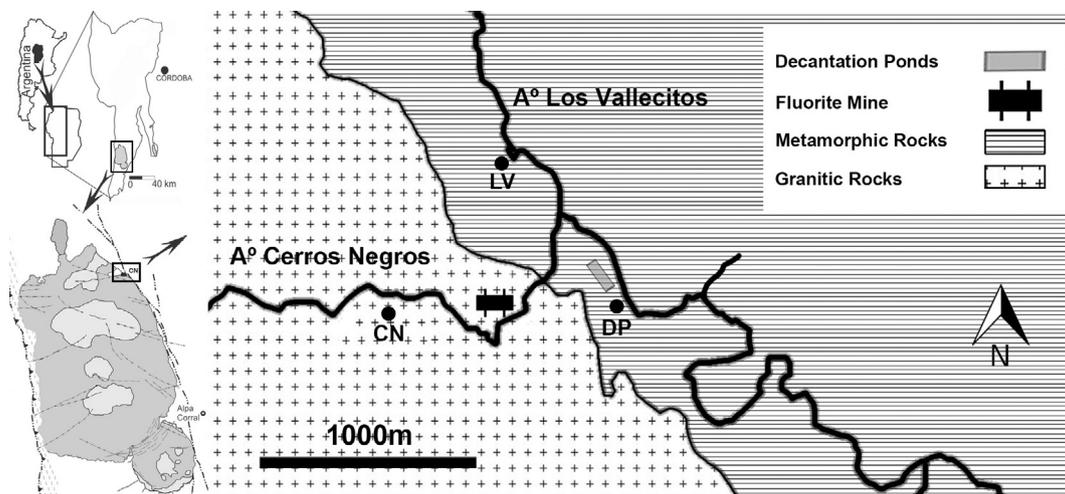


Fig. 1. Location of sampling sites in the granitic batholith Cerro Áspero in the central-south region of Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina. Black points indicate the sampling sites. Image modified from Coniglio et al. (2010).

(APHA-AWWA, 1999). Physicochemical parameters of water (temperature, pH, electrical conductivity, and salinity) were measured *in situ* with digital equipment Test TM35-Series Multiparameter 35425-10, and dissolved oxygen was measured by a meter HD3030.

2.4. Age determination

Standard methods of skeletochronology were performed (e.g., Martino and Sinsch, 2002; Bionda et al., 2015; Otero et al., 2017a). Each phalanx was cross-sectioned at a thickness of 8–10 μ through a rotary microtome Leica®RM2125RTS. Histological sections were stained for 3 min in Ehrlich's hematoxylin. Using a light microscope, Zeiss AxioPhot-Axio Lab (100 \times) equipped with digital camera Canon G10, Periosteal lines of arrested growth (LAGs) were independently recorded by two researchers. Following the suggestion of Sinsch et al. (2007), double and false lines were defined as incomplete and faint hematoxyphilic lines. The presence of Kastschenko Line (KL; the section between the endosteal and periosteal zones; Rozenblut and Ogielska, 2005) enabled us to assess endosteal resorption. The complete resorption of LAGs was also confirmed by the diameter difference between LAGs and KL (*sensu* Liao and Lu, 2010; Li et al., 2013).

2.5. Demographic traits and growth models

Demographic traits such as age at maturity (ASM), longevity, and RP were calculated according to Otero et al. (2017a,b). Growth trait was estimated according to von Bertalanffy (1938) equation: $SVLt = SVL_{max} - (SVL_{max} - SVL_{met}) e^{-K(t - t_{met})}$, where $SVLt$ = mean SVL at age t , SVL_{max} = maximum asymptotic SVL, SVL_{met} = mean SVL at metamorphosis, t = number of growing season (age), t_{met} = proportion of the growing season until metamorphosis (fixed to 0.25 for *R. arenarum* and 0.4 for *B. cordobae*), and K = growth coefficient. The growth model was regarded as a function of age and was fitted to the average growth curve by the least square procedure.

2.6. Statistical analysis

Descriptive statistics are given as mean \pm standard deviation. All parameters measured were tested for normality (Shapiro–Wilk test) and homogeneity of variances (Levene test). Water temperature, pH, salinity, and conductivity were compared using one-way analysis of variance (ANOVA). We used the nonparametric Kruskal–Wallis test to explore for significant differences in dissolved oxygen and ion concentrations between sites. Comparisons of water parameters, morphometrics, and age between sites were conducted using the pairwise post

hoc Bonferroni test. To assess the relationship between SVL and age, Pearson's correlation analysis was performed. The comparisons between sites were performed by separating sexes in each species because sexual dimorphism has been proved in both *R. arenarum* (Bionda et al., 2015) and *B. cordobae* (Otero et al., 2017a). The significance level used in all tests was $P < 0.05$. Tests were performed using the statistical packages InfoStat (Di Rienzo et al., 2012).

3. Results

3.1. Physicochemical analysis of surface water

Average values of physicochemical variables and ion concentrations in water from each sampling site and the differences between sites are shown in Table 1. The mean fluoride concentrations varied among sites and were significantly greatest in DP. pH values showed little variation around neutrality at LV and CN, whereas this parameter varied greatly into the alkaline range at DP. Dissolved oxygen was lower in DP, whereas water temperature was significantly higher for the same site. Salinity, conductivity, and most ion concentrations showed little temporal variation between streams and significantly higher values at LV. On the other hand, these parameters in DP showed high temporal variation and were extremely high with regard to the streams.

3.2. Morphological analysis

Mean SVL, weight, and BC of *R. arenarum* and *B. cordobae* for each site are shown in Table 2. Mean SVL of *R. arenarum* were not significantly different between sites in both sexes (Males: $F_{2,37} = 1.66$, $p = 0.211$; Females: $F_{2,27} = 1.17$, $p = 0.325$). Similarly, SVL of *B. cordobae* did not show differences between sites (Males $F_{2,73} = 2.98$, $p = 0.085$; Females $F_{1,18} = 1.87$; $p = 0.181$). The results for weight of *R. arenarum* males were significantly different between sites ($F_{2,37} = 9.60$; $p < 0.001$), with the lowest value registered at CN and highest value at DP. With regard to females, mean weight did not differ between sites ($F_{2,27} = 1.12$; $p = 0.242$). In *B. cordobae* we found significant differences in the weight of males between sites ($F_{2,73} = 6.80$; $p < 0.01$), with DP having individuals that weigh heavier than LV and CN. By contrast, the mean weight of females was not significantly different ($F_{1,18} = 0.84$; $p = 0.371$). BC of *R. arenarum* was statistically significant between sites for males ($H = 6.05$; $p < 0.05$), with the index higher in LV than in CN and DP. However, in females, there was not difference in this parameter ($H = 1.95$; $p = 0.223$). In *B. cordobae*, the results for BC of males were significantly different between sites ($H = 18.15$; $p < 0.001$), with the lowest value registered at CN. With

Table 1
Chemical, physical, and ion concentration data for each sampling site.

	Sites			
	LV	CN	DP	
Temperature Water (T ^W)	18.17 ± 2.7 ^A	18.72 ± 2.6 ^A	22.83 ± 4.1 ^B	F _{2,62} = 8.8; p < 0.001
pH	7.80 ± 0.2 ^A	7.55 ± 0.3 ^A	8.61 ± 0.3 ^B	F _{2,62} = 21.18; p < 0.001
Salinity (S), ppm	54.75 ± 10.6 ^A	26.46 ± 8.9 ^A	476.23 ± 382.0 ^B	F _{2,62} = 20.1; p < 0.001
Conductivity (Cond), μS/cm	112.50 ± 24.5 ^A	49.04 ± 23.5 ^A	1495.81 ± 6 ^B	F _{2,47} = 77.25; p < 0.001
Dissolved Oxygen (O), %	91.40 ± 10.6 ^A	94.90 ± 12.1 ^A	75.30 ± 12.3 ^B	H = 7.96; p = 0.018
HCO ₃ ⁻ , mg/L	70.65 ± 8.0 ^A	22.50 ± 7.1 ^B	375.0 ± 240.4 ^C	H = 12.74; p < 0.001
Sulfates (SO ₄ ⁻), mg/L	25.00 ± 0.3 ^A	8.25 ± 1.6 ^A	102.05 ± 30.2 ^B	H = 12.16; p = 0.0023
Chloride (Cl ⁻), mg/L	3.60 ± 0.1 ^A	2.9 ± 0.1 ^A	378.6 ± 232.4 ^B	H = 11.13; p = 0.0025
Sodium (Na ⁺), mg/L	7.30 ± 0.1 ^A	5.65 ± 1.5 ^A	422.65 ± 277.4 ^B	H = 11.7; p = 0.0029
Potassium (K ⁺), mg/L	0.85 ± 0.2 ^A	0.30 ± 0.1 ^A	9.60 ± 2.1 ^B	H = 12.16; p = 0.0022
Calcium (Ca ⁺⁺), mg/L	12.6 ± 5.1 ^A	4.40 ± 0.6 ^B	18.40 ± 1.1 ^C	H = 10.34; p = 0.0054
Magnesium (Mg ⁺⁺), mg/L	3.65 ± 1.7 ^A	2.20 ± 0.9 ^A	6.85 ± 2.8 ^B	H = 10.07; p = 0.0063
Fluoride (F ⁻), mg/L	0.29 ± 0.1 ^A	2.06 ± 0.5 ^B	13.8 ± 3.6 ^C	H = 9.85; p < 0.001

LV = Los Vallecitos stream, CN = Cerros Negros stream, DP = decantation ponds. Mean ± standard deviation. Different letters show inter-site pairwise differences, according to post hoc Bonferroni test $p < 0.05$.

regard to females, mean BC was not different between sites (H = 0.76; $p = 0.383$).

3.3. Skeletochronological analysis

All individuals analyzed showed recognizable bone features that enabled us to estimate age (Fig. 2). The hematoxylin-stained cross-sections of phalanges showed a series of concentric rings (LAGs) separated by broad growth layers in the periosteal bone. Well-defined Kastschenko lines were observed. In 30 individuals of *R. arenarum* (39%) and 23 individuals of *B. cordobae* (22.5%), endosteal resorption was present, but it did not hamper age assessment because the first LAG was never fully reabsorbed. In some cases, the outer LAGs were closely adjacent, but at the insertion site of the phalanx ligament, it was feasible to discern the peripheral LAGs and to account them reliably. False and double LAGs were observed, but they did not affect LAGs counted in the sample.

Life history traits of *R. arenarum* showed little variation and did not show a defined trend between sites (Table 3). Mean age was not significantly different between sites (Males: H = 0.57; $p = 0.525$; Females: H = 0.47; $p = 0.459$). Females from DP showed that ASM was three years and was higher than ASM of all other sites. Maximum longevity was five years, and it was registered in LV females and DP

males. Moreover, individuals from these sites showed a higher RP than in all other sites.

The Kruskal–Wallis test was carried out for data on the age of *B. cordobae*, and the results showed that CN males differed significantly from DP and LV males (H = 5.30; $P < 0.05$) and that LV females differed significantly from DP females (H = 6.2; $P < 0.05$). ASM was two years at LV, whereas in other sites, it was three years. The greatest longevity recorded was six years in LV females and the lowest longevity was four years in DP females. Estimated RP was higher in LV (Males = 4 years; Females = 5 years) than in the remaining sites.

3.4. Growth patterns

SVL was significantly and positively correlated with age in *R. arenarum* for all sites (LV: $r = 0.73$, $P < 0.01$; CN: $r = 0.42$, $P < 0.01$; DP: $r = 0.19$, $P < 0.05$). Meanwhile, SVL of *B. cordobae* was correlated with age in LV ($r = 0.82$, $P < 0.05$) and DP ($r = 0.42$, $P < 0.05$) but not in CN ($r = 0.24$, $P = 0.173$).

Mean and standard deviation of recently metamorphosed SVL (SVLmet) of *R. arenarum* was slightly different between sites (LV: 9.24 ± 0.78 ; CN: 9.3 ± 0.57 ; DP: 8.33 ± 0.84), whereas the SVLmet of *B. cordobae* was not different between sites (LV: 27.95 ± 2.9 ; CN: 29.4 ± 3.1 ; DP: 29 ± 2.7). The von Bertalanffy growth model

Table 2
Morphological features of adult *R. arenarum* and *B. cordobae* for each site. Mean values ± standard deviation and range (in parentheses) are given.

Variables	Males			Females			
	LV	CN	DP	LV	CN	DP	
<i>Rhinella arenarum</i>	<i>n</i>	8	16	13	12	8	
	SVL, mean (mm)	89.6 ± 14 ^A (62.1–102.3)	88.6 ± 8.6 ^A (74.4–105.3)	92.3 ± 5.8 ^A (78.83–104.1)	95.4 ± 13.6 ^A (60.1–117.3)	94 ± 6.2 ^A (85.78–106)	100.2 ± 3.4 ^A (96–109.6)
	Weight, mean (g)	87.2 ± 14.9 ^{AB} (60.8–101.9)	74.1 ± 11.5 ^A (48.5–90)	95.8 ± 16.3 ^B (78–132.6)	89.9 ± 30.9 ^A (42–144.5)	91.2 ± 20.6 ^A (57.9–119)	101.4 ± 13.1 ^A (93–120.8)
	Body Condition, mean	0.14 ± 0.41 ^A (0.04–0.21)	0.11 ± 0.33 ^B (0.08–0.18)	0.12 ± 0.03 ^B (0.09–0.19)	0.11 ± 0.03 ^A (0.06–0.17)	0.10 ± 0.02 ^A (0.09–0.14)	0.09 ± 0.01 ^A (0.08–0.11)
<i>Boana cordobae</i>	<i>n</i>	40	14	25	14	9	
	SVL, mean (mm)	48.7 ± 4.4 ^A (41–58.26)	51.0 ± 3.9 ^A (42–55.37)	47.8 ± 3.2 ^A (43.26–54)	52.8 ± 5 ^A (42–60)	–	52.2 ± 2.6 ^A (49–55)
	Weight, mean (g)	8.7 ± 1.8 ^A (6.3–13.6)	8.9 ± 1.6 ^A (6.2–12)	9.9 ± 2.2 ^B (7–15.5)	11.7 ± 3.3 ^A (7.5–17.3)	–	12.7 ± 2.1 ^A (9.6–16.1)
	Body Condition, mean	0.08 ± 0.016 ^A (0.05–0.11)	0.07 ± 0.012 ^B (0.05–0.09)	0.09 ± 0.011 ^A (0.06–0.11)	0.08 ± 0.017 ^A (0.06–0.12)	–	0.09 ± 0.011 ^A (0.07–0.10)

LV = Los Vallecitos stream, CN = Cerros Negros stream, DP = decantation ponds.

Data for females of *B. cordobae* were not obtained at CN.

Different letters show inter-site pairwise differences, according to post hoc Bonferroni test $p < 0.05$.

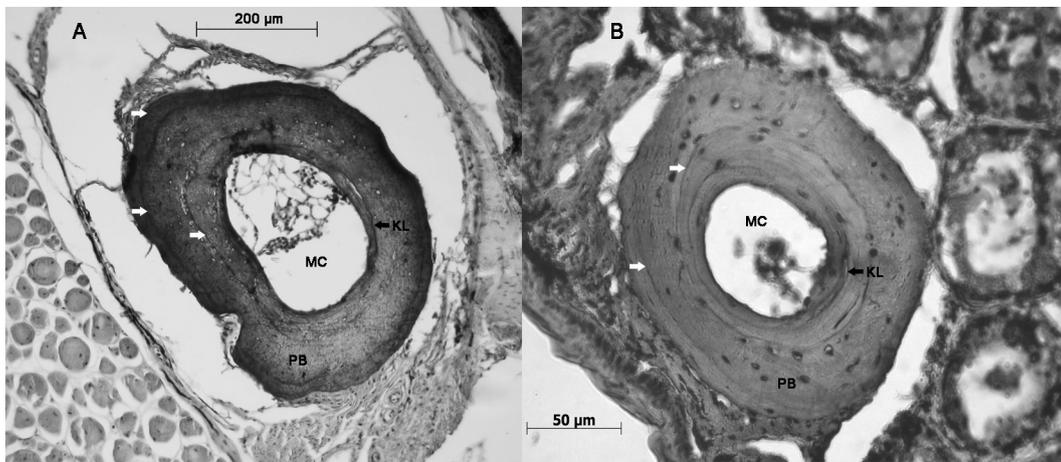


Fig. 2. Examples of phalangeal cross-sections (10-μm thick). MC = medullary cavity; PB = periosteal bone; KL = Kastschenko line; White arrows = LAGs. (A) *Rhinella arenarum* at 10×, and (B) *Boana cordobae* at 40×.

adequately fitted the age/body length data, with $r^2 > 0.842$ in *R. arenarum* and $r^2 > 0.897$ in *B. cordobae* for all sites. Growth models showed a similar shape in both species (Fig. 3).

For *R. arenarum*, the growth coefficient (K) was significantly higher in CN and DP than in LV. However, the estimated maximum asymptotic SVL (SVLmax) was higher in LV than in CN and DP (Table 3). In *B. cordobae*, a similar trend was observed in the estimated parameters by the von Bertalanffy growth model. The growth coefficient (K) of *B. cordobae* was higher in CN and DP than in LV. By contrast, SVLmax was higher in LV than in other sites.

4. Discussion

Mining activity is a cause of large alterations in environments. Many research reports have documented the impact of mining activities on hydrological and chemical properties, but there are few field studies that provide information on the response of anuran amphibians to mining pollution. Furthermore, the evaluation of pollutant effects on

naturally exposed organisms gives information on the environmental health (Hoffman et al., 2003). Simon et al. (2011) suggested that the skeletal age determination in anurans may help environmental load assessments in facilitating further monitoring to assess the effects of environmental pressures on both amphibians and their habitats. In this study, we provide the first data of life history traits and body size of two anuran species inhabiting water surfaces associated with a fluorite mine to promote the understanding of interactions between mining pollution, water quality, and the response of related anuran populations.

Fluoride is a necessary element for all animals and in appropriate doses can promote the growth and development of the skeletal system (Camargo, 2003; Zhao et al., 2013). However, it is also well-recognized worldwide as an important inorganic pollutant in water and a cause of toxicity for numerous aquatic invertebrates, fishes, and amphibians (Camargo, 2003; Goh and Neff, 2003; Chai et al., 2016). The Canadian Council of Ministers of Environment (CCME, 2002.) suggests a maximum limit of 0.12 mg/L of F-content. However, all study sites showed values above this limit. CN and DP showed higher concentrations than

Table 3

Demographic life history traits of *Rhinella arenarum* and *Boana cordobae*. For all estimates, the recently metamorphosed and juveniles of each species were included.

Variables	Males			Females		
	LV	CN	DP	LV	CN	DP
<i>Rhinella arenarum</i>						
n	8	16	19	13	12	8
Age, mean	3.2 ± 0.84 ^A	3.13 ± 0.72 ^A	3.37 ± 0.83 ^A	3.08 ± 0.98 ^A	3.18 ± 0.79 ^A	3.3 ± 0.55 ^A
ASM	2	2	2	2	2	3
Longevity	4	4	5	5	4	4
PR	3	3	4	4	3	2
K	0.39 ± 0.06	0.7 ± 0.11	0.77 ± 0.10	0.4 ± 0.06	0.76 ± 0.11	0.62 ± 0.12
(95% CI)	(0.27–0.5)	(0.49–0.92)	(0.55–0.97)	(0.26–0.51)	(0.53–0.96)	(0.48–0.79)
SVL max	125.5 ± 7.95	101.6 ± 4.95	102 ± 3.42	135.5 ± 10.7	105.8 ± 4.08	120.1 ± 13.6
(95% CI)	(104.4–145)	(91.3–113)	(94.8–109.1)	(113–156.1)	(97–114)	(95.7–140)
<i>Boana cordobae</i>						
n	40	14	25	14	–	9
Age, mean	3.37 ± 0.82 ^A	3.73 ± 0.65 ^B	3.4 ± 0.58 ^A	3.76 ± 0.66 ^A	–	3.33 ± 0.53 ^B
ASM	2	3	3	3	–	3
Longevity	5	5	5	6	–	4
PR	4	3	3	5	–	2
K	0.3 ± 0.09	0.45 ± 0.19	0.46 ± 0.13	0.32 ± 0.12	–	0.47 ± 0.16
(95% CI)	(0.18–0.55)	(0.09–0.88)	(0.19–0.78)	(0.08–0.61)	–	(0.04–0.86)
SVL max	63.2 ± 4.12	57.6 ± 7.15	54.5 ± 4.72	65.8 ± 5.79	–	59.1 ± 5.66
(95% CI)	(54.8–70.1)	(41.9–73)	(44–64.3)	(50.5–76)	–	(46–70.1)

LV = Los Vallecitos stream, CN = Cerros Negros stream, DP = decantation ponds.

Variables: n (sample size); Age Mean ± SE; ASM = age at sexual maturity (years); Longevity (years); PR = potential reproductive (years). K (growth coefficient) and SVL max (maximum asymptotic SVL) estimated by von Bertalanffy growth model and 95% confidence intervals (in parentheses).

Data for females of *B. cordobae* were not obtained at CN.

Different letters show inter-site pairwise differences, according to post hoc Bonferroni test $p < 0.05$.

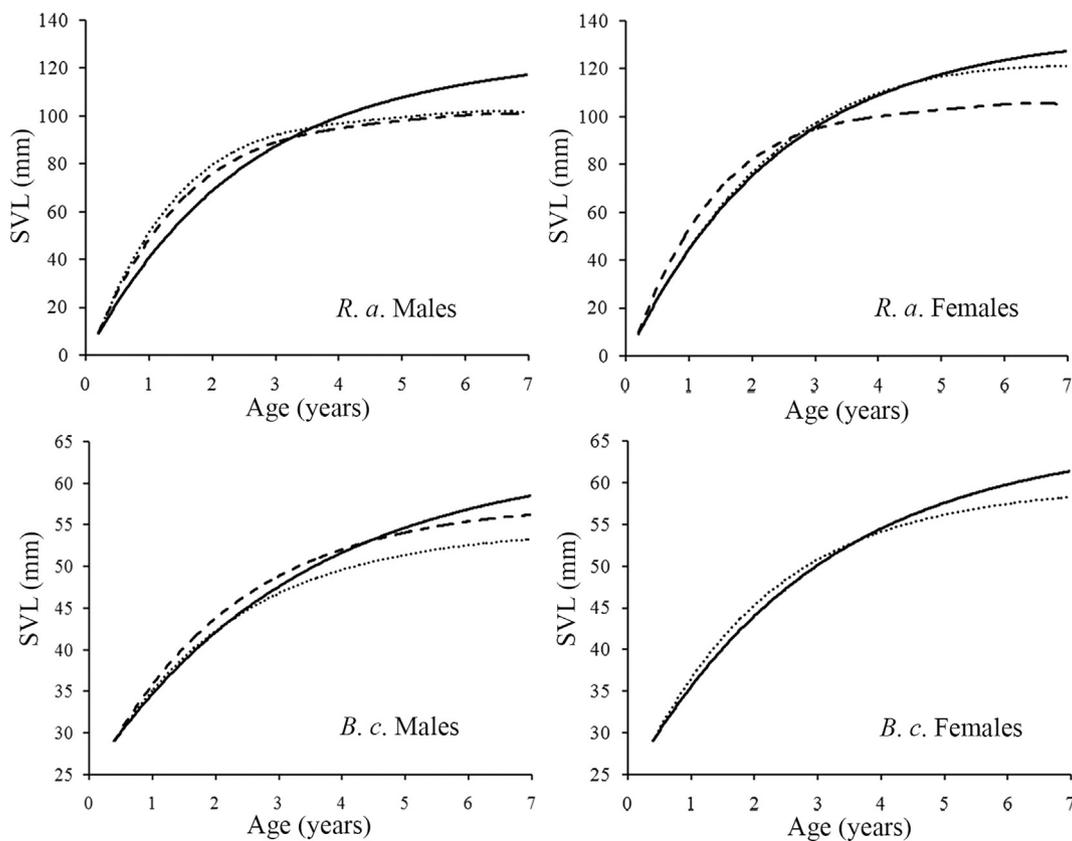


Fig. 3. Relationship between body length (SVL) and age in *Rhinella arenarum* and *Boana cordobae*. Lines represent the von Bertalanffy growth model for each site (LV: solid line; CN: dashed line; and DP: dotted line).

the value suggested by Camargo (2003) for the protection of aquatic organisms (0.5 mg/L) and the suggested by the Argentinean government (1.4 mg/L – Law 24051, 1992). Mean fluoride content registered at DP was 13.8 mg/L. This concentration was elevated, considering that inhibited growth and decreased metamorphosis rates in amphibians have been observed at 10 mg/L NaF and above (Goh and Neff, 2003; Chai et al., 2016). Moreover, preliminary results of microcosm assays show inhibition of growth and lower rate of metamorphosis in *R. arenarum* tadpoles from DP (Otero, unpublished results).

Toxicity levels of many contaminants depend mainly on pH and temperature (Hoffman et al., 2003). In our study, the values of pH differed among sites, thus showing the most basic values (8.61) at DP. This value is near to optimal limits for growth, survival, and normal development reported for amphibians ($6 < \text{pH} < 9$) (García and Fontúrbel, 2003; Addy et al., 2004; Gauthier et al., 2004). It is documented that abrupt exposure of amphibians to basic pH (≈ 9) produce mortality, whereas slight variations in pH ($7 < \text{pH} < 9$) generate sublethal effects such as embryonic abnormalities, malformations, and delay in tadpole development (Hena Muñoz and Bernal Bautista, 2011). Moreover, acid or alkaline stress could cause physiological and genetic disorders (Pough and Wilson, 1977). Furthermore, DP showed average temperatures higher than streams. This may be due to the fact that during the industrial process of fluorite flotation, the water is heated to 28 °C. In amphibians, temperature is known not only to affect behavioral performance but also to affect life history traits including growth rates, developmental rates, and adult body size (Berven, 1982).

On the other hand, dissolved oxygen was lower in DP than in the other sites. This is because DP is a lentic environment with no flow, in which the eutrophication process intensifies, thereby causing physical, chemical, and biological changes in water quality (Esteves, 2011). Hypoxic conditions have been related to tadpole mortality and to alter tadpole behavior in low concentrations of dissolved oxygen (Noland

and Ultsch, 1981). However, dissolved oxygen showed normal values for the development of amphibians in all sites ($> 60\%$; Gauthier et al., 2004).

DP also showed an increase in major ions (Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , Cl^- , SO_4^- , and HCO_3^-) and, consequently, an increase in the salinity and conductivity. A high salinity directly impacts freshwater organisms because they require holding an internal osmotic pressure relative to that in the medium. Therefore, when the salt concentration becomes very high, it may result in cellular damage and likely death (Cañedo Argüelles et al., 2013). All ion concentrations exceeding legal standards (CCME, 2002) showed that DP has poor water quality. However, DP is an artificial and isolated site, and if there is no leakage of wastewater, then the impact of mining activity on the natural streams could be limited.

Comparing biometric measures, size did not differ between sites, whereas adult individuals from DP weighed significantly heavier than individuals from streams. BC index has two components, weight and SVL. Only the first component can vary rapidly in response to environmental stress, which may be due to multiple factors such as competition, food shortage, unfavorable climatic conditions, or a poor quality of environment (Reading and Clarke, 1995). Therefore, individuals from DP may have had a higher mean weight because the environment presents a high availability of food resources and warmer temperatures that increase metabolic rate and promote digestion. Thus, the selection of this site could be explained by the reproductive and ecological characteristics of these species. The choice of DP by *R. arenarum* is possibly related to their reproductive strategy, thus preferring lentic ponds with vegetated margins and with direct sunlight incidence as oviposition sites (Bionda et al., 2011). On the other hand, *B. cordobae* could choose DP because it prefers vegetated ponds as reproduction sites, thus favoring the calling site availability (Barrio, 1962). Spear et al. (2009) and Zhelev et al. (2017) used BC as an index of

physiological health and found higher values in less disturbed environments. Similarly, in our study, *R. arenarum* showed a higher BC index in LV. However, *B. cordobae* showed conflicting results with high values of BC in the least and highest disturbed sites. These results are in accordance with those of Polo Cavia et al. (2010) and Pollo et al. (2016), which suggest that an increased BC index does not necessarily imply that individuals are in a better state of health. A habitat could lead to phenotypic variations in natural populations, thereby resulting in apparently healthy features such as a bigger body size that may not directly correlate with the true population's health state. Consequently, the BC of individuals in these sites may not be a good endpoint from which the response of anurans to fluorite mining pollution can be assessed.

Several studies from disturbed environments confirmed modifications of some demographics traits in anuran populations, principally a reduction in their average age (Attademo et al., 2014; Zhelev et al., 2014; Zamora-Camacho and Comas, 2017). The average age recorded in this study was not different between sites in *R. arenarum*, but it varied between sites in *B. cordobae*. However, as reported by Spear et al. (2009), Attademo et al. (2014) and Zhelev et al. (2014) in disturbed sites, delayed sexual maturity, and reduced longevity were observed in both species. These results support the idea that characteristics of anthropically modified environments can affect the reproductive behavior and generational age of anurans (Kutrup et al., 2011), which could lead to long-term population declines.

The timing and conditions at which organisms reach a fixed switch point between stages (e.g., hatching and metamorphosis) in species with complex life cycles are crucial in determining subsequent survival, development, and fitness (Rowe and Ludwig, 1991, Orizaola et al., 2010). Studies conducted on *B. cordobae* (Pollo et al., 2016) in the same study sites reported increased genotoxicity and lower developmental rates of tadpoles in DP. However, our study showed that growth coefficient (K) estimated at the terrestrial stage in both species was higher in altered environments, whereas SVLmax was slightly higher in populations from less disturbed sites. Therefore, populations that inhabit the less disturbed site (LV) maintain a prolonged growth period and consequently reach a larger body size at older ages than populations from sites disturbed by mining activity (DP and CN). These populations reach their maximum length more rapidly and are smaller in size at older ages. These results support the idea that organisms frequently grow at submaximal rates, and that growth can be increased after periods of unfavorable growth, what is known as compensatory growth (Metcalfe and Monaghan, 2001, Mangel and Munch, 2005). Compensatory growth mechanisms require balancing the advantage of rapid growth or development early, with the costs that a faster lifestyle can have on survival and fitness later in the ontogeny (Orizaola et al., 2010). Thus, the delayed sexual maturity, reduced longevity, and lesser RP recorded in the disturbed environment (DP) for both species, but mainly in *B. cordobae*, could be a direct effect of energy spending related to compensatory growth at juvenile stages to compensate for fewer breeding events with a higher reproductive effort in each attempt.

5. Conclusions

Differences obtained in life history traits may be explained by the lack of survival of larger/older individuals or compensatory growth, required to balance the benefits of fast growth with the costs that can have to inhabit high disturbed sites on individual fitness and survival. This plasticity in ontogeny can be the main mechanism by which some species might thrive in unfavorable environments.

The most affected species was *B. cordobae*. This tendency was mainly reflected in the variation of morphometric variables, reduced SVLmax, and the lower RP of their populations in disturbed sites. Therefore, for future studies, it is extremely important to know the biology of sentinel species because not all amphibian species may

respond in the same way to similar disturbances.

This study expands the limited number of studies *in situ* and explores the impacts of fluoride mining on anuran amphibian life history traits. Nevertheless, more long-term research is needed to evaluate the significance of observed effects on future population trends.

Acknowledgments

The authors thank the Secretary of Research and Technology of the National University of Río Cuarto (PPI18/C448) and National Agency for Scientific and Technological Promotion FONCYT (BID-PICT 0932-2012 and BID-PICT 2533-2014) for providing funds. The first, second, and third authors thank CONICET – Argentina (Argentinean National Research Council for Science and Technology) for fellowships granted. The investigation was conducted according to the state law “Protection and Conservation of Wild Fauna” (Argentina National Law No. 22.421). The present study was authorized by Cordoba Environmental Agency (A.C.A.S.E.), Environmental Secretary of Córdoba Government. The authors gratefully acknowledge the Fluorite Córdoba S.A. Company for allowing access to Los Cerros Negros mine and providing logistic support. They are also thankful to Joshua Taylor for help in correcting the English language in the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Addy, K., Green, L., Herron, E., 2004. pH and Alkalinity. University of Rhode Island, Kingston.
- Aguiar, C., Gamarrá, R., Ramirez, C., Suarez, J., Torres, C., Siu-Ting, K., 2012. Anfíbios andinos y estudios de impacto ambiental en concesiones mineras de Perú. *Alytes* 29, 88–102.
- Alford, R.A., Richards, S.J., 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 30 (1), 133–165.
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Nunes, B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2008. In situ bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 620–631.
- Antunes, S.C., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53 (2), 207–213.
- APHA-AWWA, 1999. Standard Methods for the examination of water and wastewater. Lenore, Clescerl, Greenberg y Eaton (Eds.), 20th ed., American Public Health Assoc., American Water Works Assoc., Water Environment Federation.
- Attademo, A.M., Bionda, C.D.L., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Seib, S.N., Basso, A., Junges, C.M., 2014. Edad, tamaño corporal en la madurez sexual, longevidad y potencial reproductivo de *Leptodactylus latinasus* y *Leptodactylus mystacinus* en un cultivo de soja y un bosque nativo del centro este de Argentina. *Rev. Mex. Biodivers.* 85 (1), 315–317.
- Babini, M.S., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L., 2015. Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit ecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 118–125.
- Barrio, A., 1962. Los Hylidae de Punta Lara, Provincia de Buenos Aires. Observaciones sistemáticas, ecológicas y análisis espectrográfico del Canto. *Physis* 23, 129–142.
- Berven, K.A., 1982. The genetic basis of altitudinal variation in the woodfrog *Rana sylvatica*: 1 An experimental analysis of life history traits. *Evolution* 36, 962–983.
- Bionda, C., diTada, I., Lajmanovich, R., 2011a. Composition of amphibian assemblages in agroecosystems from the central region of Argentina. *Russ. J. Herpetol.* 18 (2), 93–98.
- Bionda, C., Kost, S., Salas, N., Lajmanovich, R., Sinsch, U., Martino, A., 2015. Age structure, growth and longevity in the common toad, *Rhinella arenarum*, from Argentina. *Acta Herpetol.* 10, 55–62.
- Bionda, C., Lajmanovich, R., Salas, N., Martino, A., diTada, I., 2011b. Reproductive ecology of the common South American toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. *J. Herpetol.* 45, 261–264.
- Bionda, C., Lajmanovich, R., Salas, N., Martino, A., diTada, I., 2013. Population demography in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) and *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leiuperidae) in agroecosystems in the province of Córdoba, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 61 (3), 1389–1400.
- Bosch, B., Mañas, F., Gorla, N., Aiassa, D., 2011. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *J. Toxicol. Environ. Health. Sci.* 3 (6), 154–163.
- Burger, J., Snodgrass, J., 1998. Heavy metals in bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles: effects of depuration before analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (11), 2203–2209.
- Camargo, J.A., 2003. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere* 50,

- 251–264.
- Canadian Council of Ministers of Environment (CCME) (2002). Canadian water quality guidelines for protection of aquatic life: inorganic fluorides. pp 1–4.
- Cañedo Argüelles, M., Kefford, B.J., Piscart, C., Prat, N., Schäfer, R.B., Schulz, C.J., 2013. Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. *Environ. Pollut.* 173, 157–167.
- Castro, B.B., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2003. In situ bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut.* 125 (3), 325–335.
- Chai, L., Dong, S., Zhao, H., Deng, H., 2016. Effects of fluoride on development and growth of *Rana chensinensis* embryos and larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 126, 129–137.
- Coniglio, J.E., D'eraimo, F.J., Pinotti, L.P., Demartis, M., Agulleiro Insúa, L.A., Petrelli, H.A., 2010. Control estructural de las mineralizaciones de fluorita del Batolito Cerro Áspero, Sierras Pampeanas de Córdoba. *Rev. Asoc. Geol. Argent.* 67 (4), 507–520.
- Dimmick, C.R., Pelton, M.R., 1996. Criteria of sex and age. In: Bookhout, T.A. (Ed.), *Research and Management Techniques for Wildlife and Habitats*, fifth ed. Rev. The Wildlife Society, Bethesda, Maryland, pp. 169–2014.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2012. Grupo InfoStat Professional. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, FCA.
- Djomo, J.E., Ferrier, V., Békaert, C., 2000. Amphibian micronucleus test in vivo [Jaylet Test] to evaluate the genotoxicity of petrochemical wastewaters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 168–174.
- Donnelly, A.M., Guyer, C., Juterbock, J.E., Alford, R., 1994. Techniques for marking amphibians. In: Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.C., Foster, M.S. (Eds.), *Measuring and Monitoring Biological Diversity, Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Inst. Press, Washington, D.C, pp. 277–284.
- Driscoll, D.A., 1999. Skeletochronological assessment of age structure and population stability for two threatened frog species. *Aust. J. Ecol.* 24, 182–189.
- Duellman, W.E., Trueb, L., 1994. *Biology of Amphibians*. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Esteves, F.A., 2011. *Fundamentos de Limnología*, 2nda ed. Interciencia, Brasil.
- Flickinger, E.L., Nichols, J.D., 1990. Small mammal populations at hazardous waste disposal sites near Houston, Texas, USA. *Environ. Pollut.* 65, 169–180.
- García, G., Fontúrbel, F., 2003. *Propuestas para un desarrollo sostenible. Lago Titikaka por estrategias K*. Ed. Publicaciones Integrales. La Paz.
- Gauthier, L., Tardy, E., Mouchet, F., Marty, J., 2004. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Sci. Total Environ.* 323 (1), 47–61.
- Goh, E.H., Neff, A.W., 2003. Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. *Food Chem. Toxicol.* 41 (11), 1501–1508.
- Henaio Muñoz, L.M., Bernal Bautista, M.H., 2011. Tolerancia al pH en embriones y renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exactas, Fis. Nat.* 35 (134), 105–110.
- Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.C., Foster, M.S., 1994. *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton Jr., G.A., Cairns Jr., J., 2003. *Hand Book of Eco-Toxicology*, second ed. Lewis Publishers Boca Raton, FL.
- Keller, A., Rodel, M.O., Linsenmar, K.E., Grafe, T.U., 2009. The importance of environmental heterogeneity for species diversity and assemblage structure in Bornean stream frogs. *J. Animal Ecol.* 78, 205–3014.
- Kehr, A.I., 1994. Patrones de dispersión espacio-temporales y su influencia en la biología larval de *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura). *Neotropica* 40, 35–40.
- Kutrup, B., Cakir, E., Colak, Z., Bulbul, Z., Karaoglu, H., 2011. Age and growth of the toad, *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) from an island and a mainland population in Giresun, Turkey. *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 1469–1472.
- Lajmanovich, R.C., Cabagna Zenklusen, M.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Bassó, A., Lorenzatti, E., 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Toxicol. Environ. Mutagen.* 769, 7–12.
- Lancôt, C., Bennett, W., Wilson, S., Fabbro, L., Leusch, F.D.L., Melvin, S.D., 2016. Behaviour, development and metal accumulation in striped marsh frog tadpoles (*Limnodynastes peronii*) exposed to coal mine wastewater. *Aquat. Toxicol.* 173, 218–227.
- Lavoie, I., Lavoie, M., Fortin, C., 2012. A mine of information: benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings. *Sci. Total Environ.* 425, 231–241.
- Li, S.T., Wu, X., Li, D.Y., Lou, S.L., Mi, Z.P., Liao, W.B., 2013. Body size variation of Odorous Frog (*Odorrana grahami*) across altitudinal gradients. *Herpetol. J.* 23, 187–192.
- Liao, W.B., Lu, X., 2010. Age structure and body size of the Chuanxi Tree Frog *Hyla annectans chuanxiensis* from two different elevations in Sichuan (China). *Zool. Anz.* 248, 255–263.
- Luddecke, H., 2002. Variation and trade-off in reproductive output of the Andean frog *Hyla labialis*. *Oecologia* 130, 403–410.
- Mangel, M., Munch, S.B., 2005. A life-history perspective on short- and long-term consequences of compensatory growth. *Am. Nat.* 166, 155–176.
- Marangoni, F., Barrasso, D.A., Cajade, R., Agostini, G., 2012. Body size, age and growth pattern of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) of Argentina. *North-West J. Zool.* 8, 63–71.
- Marques, S.M., Antunes, S.C., Pissarra, H., Pereira, M.L., Gonçalves, F., Pereira, R., 2009. Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi Seoane*) from a uranium mine pond. *Aquat. Toxicol.* 91, 187–219.
- Marques, S.M., Chaves, S., Gonçalves, F., Pereira, R., 2013. Evaluation of growth, biochemical and bioaccumulation parameters in *Pelophylax perezi* tadpoles, following an in-situ acute exposure to three different effluent ponds from a uranium mine. *Sci. Total Environ.* 445, 321–328.
- Marques, S.M., Gonçalves, F., Pereira, R., 2008. Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi Seoane*. *Sci. Total Environ.* 402, 29–35.
- Martino, A.L., Sinsch, U., 2002. Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *J. Zool.* 257, 67–81.
- Metcalfe, N.B., Monaghan, P., 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? – Trends. *Ecol. Evol.* 16, 254–260.
- Muñoz-Escobar, E.M., Palacio-Baena, J.A., 2010. Efectos del cloruro de mercurio (HgCl₂) sobre la supervivencia y crecimiento de renacuajos de *Dendrosophus bogerti*. *Actual Biol.* 32 (93), 189–197.
- Noland, R., Ultsch, G.R., 1981. The roles of temperature and dissolved oxygen in microhabitat selection by the tadpoles of a frog (*Rana pipiens*) and a toad (*Bufo terrestris*). *Copeia* 1981, 645–652.
- Oggero, A., Arana, M., 2012. Inventario de las plantas vasculares del sur de la zona serrana de Córdoba. *Argentina. Hoehnea* 39 (2), 171–199.
- Orizaola, G., Dahl, E., Laurila, A., 2010. Compensating for delayed hatching across consecutive life-history stages in an amphibian. *Oikos* 119, 980–987.
- Ortiz, S.G., Acosta, J.C., Murúa, F., 2003. Fauna de vertebrados y actividad minera: estudio de línea de base en la cuenca del río castaño, san juan, argentina. *Multequina* 12, 23–35.
- Otero, M., Baraquet, M., Pollo, F., Grenat, P., Salas, N., Martino, A., 2017a. Sexual Size Dimorphism in Relation to Age and Growth in *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae) from Córdoba, Argentina. *Herpetol. Conserv. Biol.* 12, 141–148.
- Otero, M.A., Valetti, J.A., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L., 2017b. Are ploidy and age size-related? A comparative study on tetraploid *Pleurodema kriegi* and octoploid *P. cordobae* (Anura: Leptodactylidae) from Central Argentina. *Zool. Anz.* 268, 136–142.
- Pollo, F.E., Bionda, C.L., Salinas, Z.A., Salas, N.E., Martino, A.L., 2015. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environ. Monit. Assess.* 187, 1–9.
- Pollo, F., Grenat, P., Otero, M., Salas, N., Martino, A., 2016. Health status of tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) that inhabit aquatic ecosystems associated to fluorite mine. *Ecotox. Environ. Saf.* 133, 466–474.
- 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. Res.* 24 (22), 18179–18187.
- Polo Cavia, N., Engstrom, T., López, P., Martín, J., 2010. Body condition does not predict immune competence of western pond turtles in altered versus natural habitats. *Anim. Conserv.* 13 (3), 256–264.
- Pough, F.H., Wilson, R.E., 1977. Acid precipitation and reproductive success of *Ambystoma salamanders*. *Water Air Soil. Poll.* 7, 307–316.
- Reading, C.J., Clarke, R.T., 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.
- Rowe, L., Ludwig, D., 1991. Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology* 72 (2), 413–427.
- Rozenblut, B., Ogielska, M., 2005. Development and growth of long bones in European water frogs (Amphibia: Anura: Ranidae), with remarks on age determination. *J. Morphol.* 265, 304–317.
- Simon, M., Puky, M., Braun, B., Tóthmérész, B., 2011. Frogs and toads as biological indicators in environmental assessment. In: Murray, J.L. (Ed.), *Frogs: Biology, Ecology and Uses*. Nova Science Publishers Inc., New York.
- Sinsch, U., 1990. Migration and Orientation in Anuran Amphibians. *Ethol. Ecol. Evol.*

470 2(1), 65–69.

- Sinsch, U., diTada, I.E., Martino, A.L., 2001. Longevity, demography and sex-specific growth of the Pampa de Achala Toad, *Bufo achalensis* CEI, 1972. *Stud. Neotrop. Fauna E.* 36, 95–104.
- Sinsch, U., Oromi, N., Sanuy, D., 2007. Growth marks in Natterjack Toad (*Bufo calamita*) bones: histological correlates of hibernation and aestivation periods. *Herpetol. J.* 17, 129–137.
- Spear, P.A., Boily, M., Giroux, I., DeBlois, C., Leclair, M.H., Levasseur, M., Leclair, R., 2009. Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquat. Toxicol.* 91, 110–117.
- Tejedo, M., Fieques, R., 2003. Evaluación de los efectos del vertido tóxico de las minas de Aznalcóllar sobre la comunidad de anfibios del Río Guadiamar. *En Ciencia y Restauración del río Guadiamar, Consejería de Medio Ambiente*.
- Vallan, D., 2000. Influence of forest fragmentation on amphibian diversity in the nature reserve of Ambohitantely, highland Madagascar. *Biol. Conserv.* 96, 31–43.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero De Castro, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Fonovich De Schroeder, T., Pechen De D'Angelo, A.M., 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8 (3–4), 167–186.
- Vera Candiotti, J., Natale, G.S., Soloneski, S., Ronco, A.E., Larramendy, M.L., 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Afcida®. *Chemosphere* 78 (3), 249–255.
- Verga, E.G., Leynaud, G.C., Lescano, J.N., Bellis, L.M., 2012. Is livestock grazing compatible with amphibian diversity in the High Mountains of Córdoba, Argentina? *Eur. J. Wildl. Res.* 58 (5), 823–832.

- von Bertalanffy, L., 1938. A quantitative theory of organic growth. *Hum. Biol.* 10, 181–213.
- Zamora-Camacho, F.J., Comas, M., 2017. Greater reproductive investment, but shorter lifespan, in agrosystem than in natural-habitat toads. *PeerJ* 5, e3791.
- Zhao, H., Chai, L., Wang, H., 2013. Effects of fluoride on metamorphosis, thyroid and skeletal development in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Ecotoxicology* 22 (7), 1123–1132.
- Zhelev, Z., Arnaudov, A., Boyadzhiev, P., 2014. Colour polymorphism, sex ratio and age structure in the populations of *Pelophylax ridibundus* and *Pseudepidalea viridis* (Amphibia: Anura) from anthropogenically polluted biotopes in southern Bulgaria and their usage as bioindicators. *Trak. J. Sci.* 1, 1–12.
- Zhelev, Z., Tsonev, S., Arnaudov, A., 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.
- Zocche, J.J., Damiani, A.P., Hainzenreder, G., Mendonça, R.Á., Peres, P.B., dos Santos, C.E.I., Debastiani, R., Ferraz Dias, J., de Andrade, V.M., 2013. Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-casting mine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36 (1), 194–201.