
ECOTOXICOLOGÍA DE ANFIBIOS EN AGROECOSISTEMAS DEL NORESTE DE LA REGIÓN PAMPEANA

Desarrollada en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente,
Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas – UNLP

Con Becas de Postgrado Tipo I y II CONICET

A Kini y a mis viejos

*Y los días se echaron a caminar.
Y ellos, los días, nos hicieron.
Y así fuimos nacidos nosotros,
los hijos de los días,
los averiguadores,
los buscadores de la vida.*

(El Génesis, según los Mayas)

Extraído de "Los Hijos de los Días". Eduardo Galeano.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	
Anfibios en agroecosistemas	1
Plaguicidas y anfibios. Antecedentes en ecotoxicología	3
Los anfibios como bioindicadores	10
Peligrosidad de plaguicidas	11
Hipótesis y objetivos	12
CAPÍTULO I	
EFFECTO DE PLAGUICIDAS SOBRE LARVAS DE ANFIBIOS. ESTUDIOS EN CAMPO	
Introducción	17
Materiales y Métodos	20
Resultados	33
Discusión y conclusiones	48
CAPÍTULO II	
POBLACIONES DE ANFIBIOS ADULTOS EN AGROECOSISTEMAS. ADULTOS Y JUVENILES	
Introducción	60
Materiales y Métodos	62
Resultados	67
Discusión y conclusiones	74
CAPÍTULO III	
ENSAMBLES DE ANFIBIOS ADULTOS EN AGROECOSISTEMAS	
Introducción	81
Materiales y Métodos	83
Resultados	92
Discusión y conclusiones	105
CAPÍTULO IV	
PELIGROSIDAD DE PLAGUICIDAS EN LARVAS ANFIBIOS DE LA REGIÓN PAMPEANA	
Introducción	115
Materiales y métodos	117
Resultados	118
Discusión y conclusiones	120
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFÍA	135
ANEXO I: ABREVIATURAS	
ANEXO II: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA VINCULADA AL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS	

AGRADECIMIENTOS

Para aquellos que amamos lo que hacemos, el trabajo se entrelaza con la vida y pasa a ser parte fundamental de la misma. Para nosotros poder preguntar, resolver, estudiar, aprender, enseñar, investigar (verbos que conforman el trabajo de todos los días) es una forma de vida. Esta tesis ocupó algunos de los años más preciados de la mía y el agradecimiento a todas esas personas que me acompañaron a transitarlos es infinito.

Agradezco:

a mis directores, los doctores Alicia Ronco y Carlos Bonetto por el apoyo y comprensión sobre mi forma particular de trabajar;

al CONICET por las becas otorgadas;

a mis viejos, Rosa y Jorge, por todo, por tanto, y por más;

a Kini por el oído, el hombro, las manos, el sentido y el corazón;

a mis hermanos, Ariel y Jo, por ser los mejores hermanos que la vida pudo darme;

a mi familia del corazón, Viviana, Carlos, Flori, Pollo, Vanesa, Pablo, Lisa, Uma, Dante, Antonio y Cintia, por tantos años;

a Loana, por la risa;

a mis amigos, Emilio, Meme, Federico, Lía, Meki, Juliana, Esteban, Martín y Yamila por el andar;

a Agostina y Anabella por su luz;

a Pollo, por su arte;

a Boris, por las siestas;

a Diego Barrasso y Rodrigo Cajade, por las charlas, los mates, y sus enseñanzas;

to Fernanda, for being such a wonderful person;

a Pablo Saibene, Dante Ciai, Regina Draghi, Micaela Medina, Tucu Mangini, Micaela Santos, Sabrina Parisi, Juan Drovandi, Matías Rosales, Fernanda Suarez, Luisana Bala y Jimena Suarez, por las horas en el campo, y por hacer posible nuestro querido proyecto de conservación “Ranas y Sapos del fondo de tu casa”. Sin ellos esta tesis hubiera sido imposible de llevar a cabo,

a las comunidades rurales de los alrededores de la ciudad de La Plata;

a mis colegas herpetólogos y a mis compañeros de laboratorio. Especialmente a Yanina Elorriaga por su invaluable ayuda en las mesadas y a Pablo Demetrio, Federico Kacoliris y Ariel Paracampo por sus contribuciones a algunos de los análisis de esta tesis.

Gracias a todos, por su incondicional apoyo y comprensión.

Además, debo estar agradecida a todas aquellas personas que han, de diversas formas, complicado el recorrido de mi camino. Esquivando charcos he aprendido y redefinido mis convicciones sobre la manera de ver la ciencia. En un sentido más amplio, han logrado enseñarme cómo no quiero llevar a cabo mi trabajo que se refleja al fin y al cabo en la vida misma. ¡Gracias a ellos también!

RESUMEN

La Región Pampeana Argentina experimentó los cambios históricos de mayor envergadura en el uso del suelo de todo el país y concentra actualmente una gran variedad de producciones agrícolas que tienen como factor común el uso de agroquímicos. Los anfibios han logrado explotar algunos de los recursos provistos por los agroecosistemas y persistir en este paisaje alterado, encontrándose potencialmente expuestos a una gran variedad de compuestos asociados a las prácticas agrícolas de la región.

Se propuso como objetivo general estudiar el efecto de la utilización de plaguicidas empleados en agroecosistemas del noreste de la Región Pampeana sobre anfibios anuros, para lo cual fueron formulados los siguientes objetivos: 1) estudiar efectos de plaguicidas sobre larvas de *Hypsiboas pulchellus*, *Rhinella fernandezae* y *Leptodactylus latrans* en condiciones de campo. 2) Estimar densidades poblacionales en adultos de *H. pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans* incluyendo un seguimiento de anomalías e índices de condición corporal. 3) Realizar un análisis a nivel de los ensamblajes de anfibios en agroecosistemas. 4) Evaluar la peligrosidad asociada a los plaguicidas seleccionados sobre anfibios de la Región Pampeana Argentina.

Fueron estudiados los efectos sobre la supervivencia y el movimiento larval de aplicaciones de plaguicidas típicas de la región en cuatro agroecosistemas ubicados en los alrededores de la ciudad de La Plata. Las evaluaciones del efecto de plaguicidas en condiciones de campo utilizando técnicas de limnocorrales mostraron que de nueve aplicaciones, seis generaron una disminución significativa en la supervivencia de larvas de *H. pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans* en correspondencia con la detección en agua y sedimento de los plaguicidas empleados. Las aplicaciones de clorpirifós y endosulfán generaron una reducción del 100 % de la supervivencia, mientras que en las de glifosato sólo fueron observados efectos subletales en el movimiento. Los individuos afectados con pérdida de movimiento no mostraron recuperación en ninguna de las ocasiones, sino que el efecto se vio agravado entre las 24 y 48 h de exposición. Se registró un descenso de las abundancias larvales luego de pasadas 48 h de la exposición a los insecticidas. De manera general, las larvas que se desarrollan en charcas de cultivos con aplicaciones directas de plaguicidas obtuvieron menores tamaños a la metamorfosis y mayores tasas de crecimiento. Asimismo la cantidad de individuos capaces de alcanzar la metamorfosis resultó inferior en charcas pertenecientes a sitios cultivados. Se detectaron altas prevalencias de anomalías en larvas expuestas de las tres especies estudiadas. El conjunto de resultados obtenidos advierte sobre importantes efectos a nivel individual generados por exposiciones a plaguicidas en campo.

Los estudios a nivel poblacional en dos agroecosistemas con distinto uso del suelo (sitio cultivado y sitio de referencia), permitieron detectar bajas densidades poblacionales de *H. pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans* que habitan el sitio cultivado, lo cual puede estar relacionado con los efectos de las aplicaciones de plaguicidas demostrados a nivel individual. Complementariamente fueron realizados estudios sobre el índice de condición corporal y la presencia de anomalías en juveniles y adultos de las tres especies mencionadas. Apoyando lo evidenciado en los ciclos larvales, los individuos juveniles capaces de colonizar el medio terrestre tuvieron índices de condición corporal menores a aquellos juveniles del sitio de referencia, manteniéndose estas diferencias en los individuos adultos. Las prevalencias de

anormalidades fueron superiores en poblaciones de cultivos, aunque en ambos tipos de agroecosistemas resultaron superiores al nivel basal de ocurrencia natural (5%).

Interesa conocer si los efectos observados a nivel de las poblaciones pueden repercutir en los ensambles de anfibios, asumiendo con ello una escala de análisis en un nivel biológico superior. Para ello se estudiaron nueve ensambles de anfibios en agroecosistemas típicos de la región (cinco sitios cultivados y cuatro sitios con pasturas considerados de referencia). Se llevó a cabo una caracterización de los cuerpos de agua de cada agroecosistema que incluyó parámetros fisicoquímicos, espaciales, composición de la flora macrófita y niveles de concentración de plaguicidas en agua y sedimento. Se detectaron 27 plaguicidas entre los que se encuentran insecticidas, fungicidas y herbicidas. En los sitios cultivados los 27 plaguicidas estuvieron presentes, mientras que en sitios de referencia se detectó menor número y en órdenes de magnitud de concentración inferiores. Los análisis sobre los valores de riqueza específica muestran que no existen diferencias significativas entre los ensambles independientemente del uso del suelo, aunque dos especies estuvieron ausentes en sitios con mayor presencia y concentración de plaguicidas: *Ceratophrys ornata* y *Pseudis minutus*. Los análisis sobre las abundancias de especies mostraron que *H. pulchellus* fue la especie más abundante en los agroecosistemas de referencia (aunque no dominante), mientras que *Leptodactylus latinasus* fue la especie más abundante en los sitios cultivados la cual, además, fue dominante. Los resultados del análisis multivariado muestran que las mayores abundancias de especies se relacionan positivamente con las variables ambientales temperatura y oxígeno disuelto y negativamente con la presencia y concentración de plaguicidas y la distancia a sitios sin cultivos en los que se desarrollan pasturas.

Finalmente fue explorada la peligrosidad que representa la exposición a los plaguicidas ampliamente usados en la región (clorpirifós, endosulfán, cipermetrina y glifosato) sobre larvas de anfibios mediante el cálculo de índices de peligrosidad (HQ). Los resultados indican una elevada peligrosidad del endosulfán, seguido por el clorpirifós y la cipermetrina. El herbicida glifosato no mostró peligrosidad en relación a efectos agudos letales. Estos resultados, junto a los obtenidos en diferentes niveles de organización biológica, reúnen una importante evidencia sobre los efectos adversos de las prácticas agrícolas extensivas e intensivas y sostenidas en el tiempo.

Las prácticas evaluadas (modo de aplicación, tipo de plaguicidas, empleo de mezclas y estacionalidad de las aplicaciones) son típicas de la región. Cabe esperar entonces que los efectos evidenciados estén afectando a gran parte de la anfibiofauna del noreste de la Región Pampeana.

El presente trabajo propone la utilización de una serie de estrategias de evaluación del efecto de plaguicidas sobre anfibios las cuales toman relevancia si son llevadas a cabo de manera integrada y bajo un esquema de concatenación de efectos. Las mismas inician con la evaluación a nivel individual en las tempranas etapas del desarrollo larval, extrapolando los efectos a nivel de las poblaciones y los ensambles. Asimismo se proponen una serie de indicadores de efecto en los distintos niveles de organización biológica (individual, poblacional y ensambles) los cuales resultaron útiles para el diagnóstico y evaluación de los efectos producidos por los plaguicidas comúnmente utilizados en la región a través de prácticas agrícolas típicas de la misma.

INTRODUCCIÓN

ANFIBIOS EN AGROECOSISTEMAS

La agricultura ocupa la mayor proporción de tierras a nivel mundial en relación a cualquier otra actividad humana [1]. Sólo las pasturas y los cultivos se extendían en un 37 % de la superficie mundial en el año 1999 [2] y en la última década la expansión del sistema productivo agrícola sufrió un notable incremento fundamentalmente en países de América Latina. En líneas generales, la agricultura se adecuó a un paquete tecnológico simplificado y de alta productividad, integrado por cultivos transgénicos, siembra directa, mayor uso de fertilizantes y plaguicidas y, en menor medida, agricultura de precisión [3].

De los cultivos que se desarrollan actualmente en Argentina, aquellos que implementan la siembra directa de especies genéticamente modificadas se han ampliado drásticamente siguiendo la tendencia acontecida en América Latina [3]. Hasta el año 2009, 32 millones de hectáreas del territorio argentino eran destinadas a la siembra. Los cultivos de soja representaban el 50 % de esta producción pudiendo ser desarrollados en zonas que tradicionalmente no fueron destinadas a tales usos del suelo dadas las limitaciones climáticas y/o edáficas [4, 5]. Asimismo, el crecimiento de centros urbanos generó un aumento en la demanda de consumo de vegetales que puede ser abastecido localmente. De esta forma, las áreas periurbanas conforman un territorio productivo y residencial con un tipo particular de agricultura que está constituido por un entramado de explotaciones primario-intensivas conformando los denominados cinturones verdes [6]. El incremento de las actividades agrícolas en conjunto ha llevado al consecuente aumento de la utilización de plaguicidas que en Argentina triplicó su uso de 6 a 18 millones de kg, desde 1992 a 1997, incrementándose estos volúmenes en los últimos 10 años 2,5 veces en el caso de los insecticidas y 5 veces en el caso de los herbicidas [7, 8].

La Región Pampeana experimentó los cambios históricos de mayor envergadura en el uso del suelo de todo el país [9]. En la actualidad concentra una importante variedad de producciones agropecuarias, destacándose en cuanto a superficie implantada los cultivos extensivos de soja, maíz, girasol, trigo, alfalfa, sorgo y cebada, además de cultivos fruti-hortícolas [10]. En la provincia de Buenos Aires, el Cinturón Verde del Gran Buenos Aires (al cuál se adjunta el Cinturón Verde de La Plata) y el Cinturón Hortícola Marplatense concentran los cultivos de especies hortícolas destinadas al consumo interno producidos de manera intensiva bajo invernáculo y a campo. Esta amplia variedad de actividades, tanto intensivas como extensivas, se desarrolla bajo distintos sistemas de manejo y con variadas intensidades de uso de recursos. Sin embargo un factor común a toda la variabilidad productiva es el uso de agroquímicos [11].

La heterogeneidad de ambientes que conforman la Región Pampeana favorece la presencia de una importante diversidad de anfibios anuros. El noreste de esta región concentra la mayor riqueza alcanzando un total de 26 especies que habitan el complejo paisaje, incluidos los distintos tipos de agroecosistemas que en ella se desarrollan. Todas las especies de anfibios anuros de la Región Pampeana tienen un ciclo de vida bifásico con larvas acuáticas y adultos terrestres estrechamente relacionados a ambientes acuáticos. Los ciclos larvales son llevados a cabo en charcas temporarias, lagunas y pequeños arroyos que también son utilizados por los adultos para obtener alimento y refugio [12, 13].

Numerosas especies de anfibios han sido capaces de persistir en paisajes agrícolas de todo el mundo a pesar de las profundas modificaciones inherentes a esta actividad [14 - 18]. La disponibilidad de agua casi permanente que ellos ofrecen (por extracción de aguas subterráneas y por el establecimiento de vertederos y canales de

riego), permitió que algunas especies puedan utilizar estos cuerpos de agua como nuevos hábitats de reproducción [19]. De un modo más general los anfibios han sido capaces de explotar los recursos provistos por los agroecosistemas, y sobrevivir como meta-poblaciones en un paisaje alterado [20]. No obstante, se observa una tendencia a la disminución de la densidad y diversidad de anfibios en áreas altamente disturbadas [21]. Algunos autores sugieren que las modificaciones en los patrones de diversidad de anfibios que habitan paisajes agrícolas permiten inferir el despoblamiento de las especies menos tolerantes a la transformación del ambiente asociado a actividades agrícolas intensivas y sostenidas en el tiempo [22].

PLAGUICIDAS Y ANFIBIOS.

ANTECEDENTES EN ECOTOXICOLOGÍA

La toxicología ha sido tradicionalmente definida como la ciencia que estudia cualitativa y cuantitativamente los efectos adversos de agentes físicos y químicos sobre un sujeto o una población de sujetos. Un enfoque clave de la toxicología aplicada es evaluar la causalidad de las interacciones y su evolución en el tiempo (exposición) entre las entidades biológicas (sujeto) de diferente susceptibilidad intrínseca y las entidades fisicoquímicas (agentes) de diferente potencia intrínseca [23]. En este contexto el estudio de las interacciones dosis-respuesta implica la identificación de posibles efectos sobre la salud humana relacionados con la exposición a los tóxicos y el establecimiento de niveles de exposición que no devengan en efectos adversos [24]. Desde una perspectiva ecotoxicológica, la cual pretende estudiar los contaminantes en la biosfera y sus efectos sobre los componentes de la biosfera, numerosos autores han sugerido la incorporación de condiciones que provean más realismo a las evaluaciones de toxicidad [25, 26]. En este contexto fueron postuladas una serie de recomendaciones como la

utilización de especies nativas, la incorporación de variabilidad genética, el estudio de distintos estadios de desarrollo y la utilización de concentraciones de contaminantes ambientalmente relevantes [27]. Una herramienta fundamental para la evaluación de los efectos de un compuesto en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos son los bioensayos de toxicidad de laboratorio, para los que han sido desarrollados protocolos junto a una extensa gama de puntos finales o parámetros de respuesta que evalúan efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos [28 - 31].

Los efectos de plaguicidas particularmente sobre anfibios a través de bioensayos de toxicidad, han sido ampliamente estudiados y fueron resumidos en distintos trabajos de revisión [32, 33]. Los anfibios fueron utilizados como organismos *test* en investigaciones de toxicología en una amplia batería de estudios llevados a cabo principalmente para identificar y caracterizar el peligro potencial y los mecanismos de acción que entrañan los plaguicidas [34 - 37]. Asimismo, una perspectiva ecotoxicológica fue abordada y motivada porque el uso de plaguicidas asociados a prácticas agrícolas se propuso como uno de los mayores causantes del fenómeno de declinación mundial de anfibios [38]. Este trabajo incluyó numerosos bioensayos de toxicidad que evaluaron concentraciones letales medias (CL_{50}) y efectos subletales sobre el desarrollo, el crecimiento y la reproducción de anfibios [33, 39].

Los estudios con plaguicidas que interesan abordar en el marco conceptual de este trabajo de tesis son aquellos conducidos con los insecticidas clorpirifós, endosulfán y cipermetrina y el herbicida glifosato, los cuales encabezan las listas de comercialización de agroquímicos de Argentina [40]. En la Región Pampeana se registra el mismo patrón de uso de plaguicidas que son empleados tanto en agricultura de tipo extensiva como intensiva [11].

CLORPIRIFÓS

El clorpirifós (0,0-dietil 0-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato/ CAS# 2921-88-2) es un insecticida organofosforado de amplio espectro empleado en el control de plagas de productos alimenticios, césped y plantas ornamentales [41]. En EEUU fue extensamente utilizado en entornos residenciales y aunque fue prohibido para tales usos en el año 2000, continuó siendo uno de los plaguicidas más usados en prácticas agrícolas [42]. En Argentina fue prohibida la venta de formulaciones de uso doméstico en el año 2008 [43], pero actualmente es el insecticida de uso agrícola más vendido del país [40]. Al igual que otros insecticidas organofosforados, el clorpirifós inhibe la función de la colinesterasa, uniéndose a la acetilcolinesterasa (una enzima implicada en la neurotransmisión) y produciendo efectos neurotóxicos en insectos y organismos no blanco [41]. Es clasificado como moderadamente peligroso por la OMS y moderadamente tóxico por USEPA, siendo en el caso de los anfibios de moderadamente hasta muy altamente tóxico. Se han publicado efectos letales y subletales sobre larvas de anfibios mediante bioensayos de toxicidad pero pocos de ellos fueron conducidos con clorpirifós en formulaciones comerciales [44]. Las CL_{50} mencionadas en la literatura abarcan el intervalo de 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ a 3 mg/L para larvas y embriones de anfibios [39, 45 - 47] a la vez que se han evidenciado efectos subletales como la inhibición de la actividad colinesterasa y las alteraciones en el comportamiento [48], la presencia de malformaciones [49] y efectos sobre el crecimiento y la metamorfosis [50]. En especies nativas de Argentina, efectos letales y subletales fueron obtenidos bajo concentraciones de exposición inferiores a 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ en larvas de *Hypsiboas pulchellus* [45] y efectos letales y subletales en larvas de *Rhinella fernandezae* en concentraciones de 1 a 5 mg/L [47].

ENDOSULFÁN

El endosulfán (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina-3-óxido/ CAS# 115-29-7) es un insecticida clorado utilizado en una amplia variedad de cultivos alimentarios, fue prohibido en países de la Unión Europea y Asia y su uso agrícola también está prohibido en EEUU [51]. Recientemente Argentina legisló el uso del endosulfán prohibiendo la importación del principio activo y sus formulados (desde el 1 de julio de 2012) y su elaboración y uso (desde el 1 de julio de 2013), sin embargo durante el desarrollo de esta tesis fue el segundo plaguicida en la escala de venta de agroquímicos [40]. El endosulfán se une y bloquea los canales de Cl⁻ vinculados al receptor γ -amino-butírico (GABA_A). Cuando el GABA se une a su receptor GABA_A, los canales de Cl⁻ se abren produciendo una hiperpolarización de la membrana nerviosa deteniendo la excitación. El endosulfán bloquea e impide la entrada de Cl⁻ a la neurona y por lo tanto su efecto resulta en una excitación incontrolada [52]. Además, existe evidencia de que el endosulfán actúa como un disruptor endócrino y es bioacumulable [51]. Es clasificado como moderadamente peligroso por la OMS y altamente tóxico por USEPA, siendo en el caso de los anfibios de moderadamente hasta muy altamente tóxico [44]. Han sido evidenciados efectos letales y subletales sobre larvas que demuestran la alta toxicidad de este compuesto. Las CL₅₀ para un gran número de especies exóticas abarcan un rango de 1,3 $\mu\text{g/L}$ a 4700 $\mu\text{g/L}$ [53 - 55]. Concomitantemente fueron publicados efectos sobre el crecimiento y desarrollo de anomalías y los efectos sobre el comportamiento también fueron demostrados en relación a la actividad neurotóxica de este compuesto [46, 56]. La CL₅₀ de formulados comerciales para la especie nativa *H. pulchellus* resultó de 0,13 $\mu\text{g/L}$ [57]. Respecto de los efectos subletales, fueron observados cuadros de narcosis en concentraciones de

0,01 $\mu\text{g}/\text{L}$ a las 24 h de exposición y formación de micronúcleos en concentraciones superiores a 0,010 $\mu\text{g}/\text{L}$ [57, 58].

CIPERMETRINA

La cipermetrina (1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato de (RS)-ciano-3-fenoxibencilo/ CAS# 52315-07-8) es un insecticida piretroide utilizado en cultivos de soja, maíz, trigo, algodón, frutas y hortalizas. También se utiliza en el control de plagas de insectos en ambientes residenciales [59]. En Argentina es el tercer insecticida de uso agrícola en ventas del mercado [40]. Su sitio de acción, particularmente en vertebrados, es en los canales de Na^{++} de las membranas nerviosas a nivel del sistema nervioso central [60]. Como compuesto activo, la cipermetrina es una mezcla de 8 isómeros, los cuales cuentan con distintas propiedades biológicas y químicas por lo que pueden presentar distinta toxicidad [61]. La OMS ha considerado a los isómeros ζ y α altamente peligroso y moderadamente peligro respectivamente, mientras que la USEPA no ha tenido un consenso de acuerdo a la categoría de toxicidad de ninguno de ellos [44]. Varios estudios han indicado que los piretroides son altamente tóxicos para un número de organismos no-blanco. Se han registrado efectos subletales de piretroides sobre larvas de anfibios pero los datos sobre efectos letales en especies de anuros son escasos. La CL_{50} 48 h de *Rana temporaria* fue de 6,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ [62] y la CL_{50} 96 h para *Duttaphrynus melanostictus* fue de 9 $\mu\text{g}/\text{L}$ [63]. En especies nativas de Argentina las LC_{50} de formulaciones comerciales corresponden a 175,2 $\mu\text{g}/\text{L}$ para *H. pulchellus* [64] y 129 $\mu\text{g}/\text{L}$ para *Physalaemus biligonigerus* [65]. Los efectos subletales advertidos para este plaguicidas en *H. pulchellus* fueron desarrollo de malformaciones, efectos sobre el crecimiento y el comportamiento en concentraciones superiores a 0,83 $\mu\text{g}/\text{L}$ [64], apoptosis celular en *R. arenarum* bajo

concentraciones de 39 $\mu\text{g/L}$ [66] y formación de micronúcleos en *Odontophrynus occidentalis* en concentraciones superiores a 0,7 $\mu\text{g/L}$ [67].

GLIFOSATO

El glifosato (*N*-(fosfonometil) glicina /CAS# 9008-02-0) es un herbicida post emergente, sistémico y no selectivo que se utiliza en entornos residenciales, a su vez que es empleado en una gran variedad de cultivos y es producido en diversas formulaciones comerciales. Actualmente, los cultivos transgénicos con variedad RR (*Raundup Ready*) han hecho que la demanda y uso del glifosato aumenten de manera formidable a nivel mundial [3]. En Argentina es el herbicida más utilizado y las distintas variedades y formulaciones del mismo se encuentran encabezando las listas de ventas de agroquímicos del país [40]. Es considerado como probablemente no peligroso por la OMS y levemente peligroso por USEPA [44]. El glifosato causa la inhibición de la síntesis de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, pero dado que estos son incorporados a partir de dieta por muchos animales, tiene una baja toxicidad sistémica en humanos y vertebrados en general [68]. Alternativamente, estudios realizados con bioensayos de laboratorio demostraron la toxicidad del glifosato para larvas de anfibios detectando efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y la aparición de anomalías corporales y de gónadas [69, 70]. Aunque los efectos de este herbicida fueron extensamente estudiados en especies de distintos lugares del mundo, en Argentina sólo se conocen efectos sobre la supervivencia y malformaciones de *H. pulchellus* y *Scinax nasicus* [71 - 73].

ECOTOXICOLOGÍA DE ANFIBIOS EN CONDICIONES DE CAMPO

Como fue indicado en los párrafos precedentes, una plétora de estudios demostró el efecto nocivo de los plaguicidas sobre anfibios y las herramientas ecotoxicológicas, como los ensayos de laboratorio, permitieron un gran avance del conocimiento en materia de toxicidad, aunque la complejidad de factores operantes en ecosistemas marca la necesidad de caracterizar más acabadamente los potenciales impactos de exposiciones a contaminantes en escenarios de campo [38]. Es importante tener en cuenta que los efectos de la contaminación ocurren en la naturaleza y afectan poblaciones, comunidades y ecosistemas, asociados a un nivel de complejidad que no puede ser fácilmente replicado en el laboratorio [74]. Por lo tanto, de manera complementaria a este tipo de estrategia, recientemente se ha puesto de manifiesto la necesidad de orientar los futuros esfuerzos de investigación al estudio de los efectos de plaguicidas en condiciones ambientalmente relevantes, con el objetivo de comprender la naturaleza de los mismos junto a la identificación de los factores de riesgo operantes [27, 75]. Sin embargo, el desarrollo de estudios en condiciones naturales encuentra sus limitaciones cuando se intentan aislar e identificar los efectos que están siendo producidos por la exposición a plaguicidas de aquellos generados por otros factores de estrés intrínsecos de los agroecosistemas y cuando se pretende establecer la relación causal efecto-exposición [76]. Para ello fueron sugeridas estrategias de evaluación de toxicidad que integran condiciones de exposición ambientalmente relevantes con la identificación de los factores de estrés intervinientes, los cuales pueden ser controlados y/o medidos. Estas técnicas incluyen metodologías de micro y mesocosmos como una alternativa a las evaluaciones de toxicidad de plaguicidas que emplean ensayos estandarizados de laboratorio [74].

En Argentina, se han desarrollado estudios de los efectos de plaguicidas sobre larvas de anuros utilizando bioensayos de toxicidad los cuales se mencionaron

anteriormente, pero pocos trabajos fueron conducidos en condiciones naturales. Se demostraron efectos letales de aplicaciones sobre larvas en charcas temporarias de agroecosistemas [57, 77], disminución en parámetros fisiológicos y actividad enzimática [78], así como también han sido evidenciados residuos de compuestos organoclorados en ejemplares adultos [79]. Siguiendo lo acontecido en el estado del arte actual a nivel mundial, es escasa la información sobre los efectos de plaguicidas en condiciones reales de exposición provenientes de investigaciones en campo a largo plazo [27]. Un adecuado estudio que establezca la incidencia real de los plaguicidas sobre las poblaciones y los ensambles, o cómo la exposición en estadios larvales puede generar efectos en individuos adultos y por la tanto en niveles de organización superiores [80, 81] resultan necesarios para generar información sobre los riesgos que atraviesan los anfibios de la Región Pampeana.

LOS ANFIBIOS COMO BIOINDICADORES

Los anfibios cuentan con un ciclo de vida bifásico, con larvas acuáticas que mediante un proceso de metamorfosis originan individuos adultos terrestres [82]. Un característico tegumento, altamente permeable, cuya estructura resulta fundamental para el intercambio gaseoso y un desarrollo expuesto con larvas acuáticas los hace particularmente sensibles a la exposición a contaminantes [83]. Estas características hacen de especial interés su estudio en el marco de una investigación ecotoxicológica, ya que permiten evaluar ambientes acuáticos que funcionan como cuerpos receptores de contaminación, así como también ambientes terrestres que sufren la aplicación directa de plaguicidas.

Los anfibios son propuestos como excelentes bioindicadores de la calidad ambiental. A las características ya mencionadas se le suma el escaso desplazamiento

que pueden efectuar la mayoría de las especies. Los individuos adultos no se alejan de los sitios donde eclosionan y se desarrollan como larvas y por lo tanto pueden funcionar como centinelas de las condiciones locales [84]. Dadas las características mencionadas anteriormente, los anfibios presentan una alta sensibilidad a los contaminantes ambientales. La contaminación química aportada por actividades agrícolas intensivas y extensivas es propuesta como causante de las declinaciones y extinción de poblaciones de anfibios acontecidas a nivel mundial [85].

PELIGROSIDAD DE PLAGUICIDAS

La evaluación de riesgo ecológico es definida como el proceso de asignación de magnitudes y probabilidades a los efectos adversos de actividades humanas o catástrofes naturales [86]; o como el conjunto de métodos científicos formales para la estimación de magnitudes y probabilidades de efectos adversos producidos sobre organismos y ecosistemas como resultado de eventos en el ambiente, incluyendo la liberación de contaminantes, modificaciones físicas y desastres naturales [87]. En términos generales, **riesgo** químico es la probabilidad de que ocurra un efecto adverso por exposición a un compuesto tóxico o mezcla [88]. La caracterización más sencilla de un riesgo puede ser realizada en función de cocientes que responden a una comparación de valores únicos de efecto y exposición en cada uno de los escenarios [89]. El valor obtenido por estos cocientes es útil como herramienta de aproximación al riesgo aunque *sensu estricto* representan un **peligro**, dado que no está asociado a una probabilidad de ocurrencia. Las limitaciones de su uso se centran en que debe asumirse que las condiciones de exposición y efecto ocurren en todo momento y en todo lugar [90]. El análisis de la peligrosidad de un determinado compuesto puede ser enmarcado dentro de las primeras instancias de la evaluación del riesgo ecológico. De esta manera es preciso

realizar una adecuada caracterización de la exposición, así como también una adecuada caracterización de los efectos.

El desarrollo y utilización de cocientes de peligrosidad y riesgo, ha tenido un amplio debate en la ecotoxicología actual [89]. Los mismos pueden ser estimados a través de relaciones de Toxicidad /Exposición (TER: *Toxicity/Exposure Ratios*) y los cocientes de Peligro (HQ: *Hazard Quotients*).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como ha sido mencionado anteriormente, resulta verdaderamente complejo realizar estudios que provean información unívoca sobre el efecto de la exposición a plaguicidas a nivel poblacional o de los ensambles, sobre todo en ambientes donde se encuentran operando múltiples factores de estrés. En virtud de este escenario fue adoptada para este estudio la concepción propuesta por Newman & Clements [91], en la cual la ecotoxicología se desarrolla dentro del paradigma de una ciencia jerárquica y por lo tanto, los efectos entre los distintos niveles de organización pueden extrapolarse entre sí. Bajo este esquema de análisis los mecanismos que explican los efectos de un nivel de organización biológica particular son frecuentemente buscados en el o los niveles inmediatamente inferiores, mientras que la significancia del efecto es buscada en el nivel o los niveles superiores. Para el caso particular de este trabajo se asumió el marco conceptual de que aquellos efectos producidos a nivel del individuo pueden aportar información sobre los que están siendo advertidos tanto a nivel poblacional como a nivel de los ensambles (Fig. 1).

La hipótesis general de trabajo postula que los anfibios habitantes de sitios sometidos a una intensa actividad agrícola, con pulsos de contaminación por parte de la aplicación de plaguicidas, muestran efectos a nivel individual, poblacional y del

ensamble. Se propone como objetivo general conocer el efecto de la utilización de plaguicidas empleados en agroecosistemas del noreste de la Región Pampeana sobre anfibios anuros, para lo que fueron formulados los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar efectos de plaguicidas sobre larvas de *H. pulchellus*, *R. fernandezae* y *Leptodactylus latrans* en condiciones de campo, incluyendo puntos finales evidenciados en ensayos de laboratorio. Para ello serán utilizados ensayos con limnocorrales (*enclausure*) y se realizará un seguimiento de los ciclos larvales que ocurren bajo exposición a plaguicidas.
- Estimar la densidad poblacional en adultos de *H. pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans* estableciendo si los efectos inducidos por los plaguicidas sobre larvas se ven reflejados en la estructura de las poblaciones estudiadas, incluyendo un seguimiento de anomalías e índices de condición corporal.
- Realizar un análisis de estructura de los ensambles de anfibios, contemplando nueve agroecosistemas representativos de la región con distinto grado de modificación y disturbio en relación al uso de plaguicidas. Acompañando a esto se desarrollará una caracterización de los parámetros fisicoquímicos y espaciales y se realizarán determinaciones de plaguicidas en agua y sedimento en los cuerpos de agua de cada agroecosistema.
- Finalmente, se propone realizar una evaluación de la peligrosidad asociada a los plaguicidas seleccionados sobre estadios larvales de anfibios de la Región Pampeana Argentina utilizando cocientes de peligrosidad.

Figura 1: Esquema conceptual de estudio. Se marca entre rectángulos grises cada uno de los capítulos con sus objetivos específicos. Las líneas rosadas plantean la relación lógica de las inferencias realizadas entre los niveles de organización, teniendo en cuenta que el estudio se desarrolla dentro de un paradigma que considera a la ecotoxicología como una ciencia jerárquica. **A:** Los efectos de plaguicidas sobre larvas a partir de ensayos de laboratorio (recopilados en información bibliográfica) ocurren en condiciones reales de exposición. **B:** Los efectos de los plaguicidas a nivel individual se ven reflejados en los parámetros poblacionales. **C y D:** los indicadores de efecto a nivel individual y poblacional inciden en la estructura de los ensamble.

Reconocimiento y selección de efectos letales y subletales de los plaguicidas ampliamente usados en actividades agrícolas del noreste de la Región Pampeana (clorpirifós, endosulfán, cipermetrina, y glifosato) sobre larvas de anfibios en ensayos de laboratorio.

MARCO TEÓRICO

LA ECOTOXICOLOGÍA SE DESARROLLADA DENTRO DEL PARADIGMA DE UNA CIENCIA JERÁRQUICA, EN LA CUAL, LOS EFECTOS ENTRE LOS NIVELES DE ORGANIZACIÓN PUEDEN EXTRAPOLARSE ENTRE SÍ.

A

CONTRASTACIÓN

HIPÓTESIS

LOS ANUROS QUE HABITAN SITIOS SOMETIDOS A UNA INTENSA ACTIVIDAD AGRÍCOLA, CON CONTAMINACIÓN POR PARTE DE LA APLICACIÓN DE PLAGUICIDAS, MUESTRAN EFECTOS A NIVEL INDIVIDUAL, POBLACIONAL Y DEL ENSAMBLE.

CONTRASTACIÓN

CONTRASTACIÓN

I. EFECTO DE PLAGUICIDAS SOBRE LARVAS DE ANFIBIOS. ESTUDIOS EN CAMPO

OBJETIVOS

EVALUAR EFECTOS DE PLAGUICIDAS SOBRE LARVAS DE *HYPISOBAS PULCHELLUS*, *RHINELLA FERNANDEZAE* Y *LEPTODACTYLUS LATRANS* EN CONDICIONES DE CAMPO, INCLUYENDO LOS PUNTOS FINALES QUE FUERON EVIDENCIADOS EN LOS ENSAYOS DE LABORATORIO. SE REALIZARÁ UN SEGUIMIENTO DE LOS CICLOS LARVALES QUE OCURREN BAJO EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS.

II. POBLACIONES DE ANFIBIOS EN AGROECOSISTEMAS. JUVENILES U ADULTOS

OBJETIVOS

ESTIMAR LA DENSIDAD POBLACIONAL EN ADULTOS DE *HYPISOBAS PULCHELLUS*, *RHINELLA FERNANDEZAE* Y *LEPTODACTYLUS LATRANS* Y ESTABLECER SI LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LOS PLAGUICIDAS SOBRE LARVAS SE VEN REFLEJADOS EN LA ESTRUCTURA DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS. SE REALIZARÁ ADEMÁS UN SEGUIMIENTO DE LAS MALFORMACIONES E ÍNDICES DE CONDICIÓN CORPORAL.

III. ENSAMBLES DE ANFIBIOS ADULTOS EN AGROECOSISTEMAS

OBJETIVOS

REALIZAR UN ANÁLISIS DE ESTRUCTURA DE LOS ENSAMBLES DE ANFIBIOS EN NUEVE AGROECOSISTEMAS DE LA REGIÓN, ACOMPAÑADO DE UNA CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y ESPACIALES Y DETERMINACIONES DE PLAGUICIDAS EN AGUA Y SEDIMENTO DE LOS CUERPOS DE AGUA DE CADA AGROECOSISTEMA.

IV. PELIGROSIDAD DE PLAGUICIDAS EN LARVAS DE ANFIBIOS

OBJETIVOS

REALIZAR UNA EVALUACIÓN DE LA PELIGROSIDAD ASOCIADA A LOS PLAGUICIDAS SELECCIONADOS SOBRE LOS ANFIBIOS DE LA REGIÓN PAMPEANA ARGENTINA.

B

D

C

CAPÍTULO I

EFFECTO DE PLAGUICIDAS SOBRE LARVAS DE ANFIBIOS. ESTUDIOS EN CAMPO

INTRODUCCIÓN

En el nordeste de la Región Pampeana se desarrollan prácticas agrícolas de una gran variedad de cultivos. Particularmente en el Partido de La Plata el uso del suelo destinado a la agricultura representa el 52% del territorio, donde se desarrollan cultivos de hortalizas (a campo y bajo invernadero) concentrados en el Cinturón Verde Platense y cultivos extensivos de soja, maíz y trigo [92]. Estas prácticas están asociadas a un importante uso de plaguicidas entre los que se encuentran el clorpirifós, el endosulfán, la cipermetrina y el glifosato [11]. A estos agroecosistemas se asocian cuerpos de agua temporarios formados en las depresiones del terreno o arroyos y cauces (frecuentemente de origen artificial) los cuales resultan ser colectores de agua de escorrentía proveniente de los cultivos. Los cuerpos de agua temporarios son importantes hábitats para los anfibios y otra fauna silvestre que pueden verse afectados por el ingreso de plaguicidas desde distintas fuentes [57, 93 - 95]. Si bien las 16 especies de anfibios anuros que se distribuyen en la región ocupan diversos hábitats espacial y temporalmente, dependen de estos sitios para reproducirse [96].

Las especies de anfibios de la región tienen un desarrollo larval cuyo ciclo se cumple en ambientes acuáticos, generalmente de tipo léntico y de poca profundidad [12]. El tiempo en que cada especie tarda en cumplir su ciclo larval y el tipo de manejo del agroecosistema del cual dependen las aplicaciones de plaguicidas (frecuencia, cantidad y tipo), determinan conjuntamente los modos de exposición. Además deben considerarse las rutas de ingreso de plaguicidas a los sistemas acuáticos, que pueden ocurrir por aplicación directa, por deriva o bien por el efecto de las lluvias ocurridas luego de las aplicaciones que aportan pulsos de toxicidad por escorrentía [97, 98]. Estudios conducidos en agroecosistemas de la Región Pampeana han demostrado que en ambientes lóticos la escorrentía proporciona una mayor vía de entrada a los sistemas

acuáticos superficiales que la deriva [77, 99, 100], sin embargo las aplicaciones directas (por *spray*) podrían constituir la mayor fuente de riesgo sobre cuerpos de agua de tipo lénticos y someros [57]. La persistencia de la toxicidad de los plaguicidas comúnmente usados en la región, es alta pero puede variar dependiendo del plaguicida aplicado y el organismo en que se evalúa el efecto [100 - 102]. Bajo estos escenarios cambiantes, las exposiciones a los plaguicidas de anfibios de la Región Pampeana (fundamentalmente en su fase de vida acuática) podrían estar ocurriendo con características pulsátiles induciendo efectos agudos, o bien bajo condiciones crónicas.

Como ha sido mencionado anteriormente, durante los últimos años ha acaecido un importante avance en el conocimiento de los efectos de plaguicidas sobre larvas, fundamentalmente a partir de ensayos de laboratorio [27, 83], pero la extrapolación de estos efectos a condiciones de exposición ambiental resulta un tema controversial, motivando la necesidad de realizar estudios con poblaciones nativas bajo escenarios reales en campo [19, 27, 74, 103]. Hasta el año 2005 sólo 19 estudios ecotoxicológicos en campo fueron conducidos utilizando anfibios esta cifra no se vio aumentada significativamente hasta el año 2010 [27, 74].

Varios autores [46, 55, 56, 104] sugieren que las exposiciones crónicas (con bajos niveles de plaguicidas en el ambiente y a largo plazo) podrían ser más perjudiciales para las larvas que las exposiciones agudas (altos niveles de plaguicidas en corto plazo) generando una amplia variedad de efectos subletales, por lo que aquellos estudios ecotoxicológicos que se centran en las respuestas subletales de fases larvarias, serían básicos para comprender el impacto real de los plaguicidas sobre la fauna nativa de anfibios [105, 106].

Una amplia gama de estudios ha demostrado que el efecto de los plaguicidas sobre larvas de anfibios puede depender de las condiciones de exposición, (pH, OD y

temperatura) [107 - 110]. Adicionalmente los contaminantes antrópicos pueden generar efectos tóxicos indirectos, ocasionado disminución de recursos alimenticios o cambios en las relaciones intra e interespecíficas, como competencia o depredación [111 - 114]. En vista de estos modelos aumenta la relevancia de realizar estudios ecotoxicológicos en condiciones de exposición a campo.

En base a información disponible en la literatura sobre efectos letales y subletales (en ensayos de toxicidad) inducidos por los agroquímicos más utilizados en la región, fueron seleccionados puntos finales para la evaluación de las aplicaciones de plaguicidas [32, 33, 45, 49, 57, 64, 73]. En el presente capítulo se propone como objetivo evaluar efectos de plaguicidas sobre larvas de *Hypsiboas pulchellus*, *Rhinella fernandezae* y *Leptodactylus latrans* en escenarios de exposición a campo. Para ello se estudiaron los efectos de dos aplicaciones de glifosato (GLY), una aplicación de endosulfán (END), una aplicación de clorpirifós (CLOR), cuatro aplicaciones de la mezcla cipermetrina-glifosato (CY-GLY) y una aplicación de la mezcla cipermetrina-glifosato-endosulfán (CY-GLY-END) sobre la supervivencia y las alteraciones del comportamiento (movimiento), por medio de ensayos controlados en condiciones de campo utilizando limnocorrales. Complementariamente, se realizó un recuento del número de puestas y huevos luego de ocurrida la reproducción, y durante el ciclo larval se estudió la abundancia, el crecimiento, el desarrollo, tiempo y tamaño a la metamorfosis y presencia de anormalidades en larvas expuestas a las aplicaciones ya mencionadas. Para una mejor visualización de los puntos finales evaluados recurrir a la Figura 2.

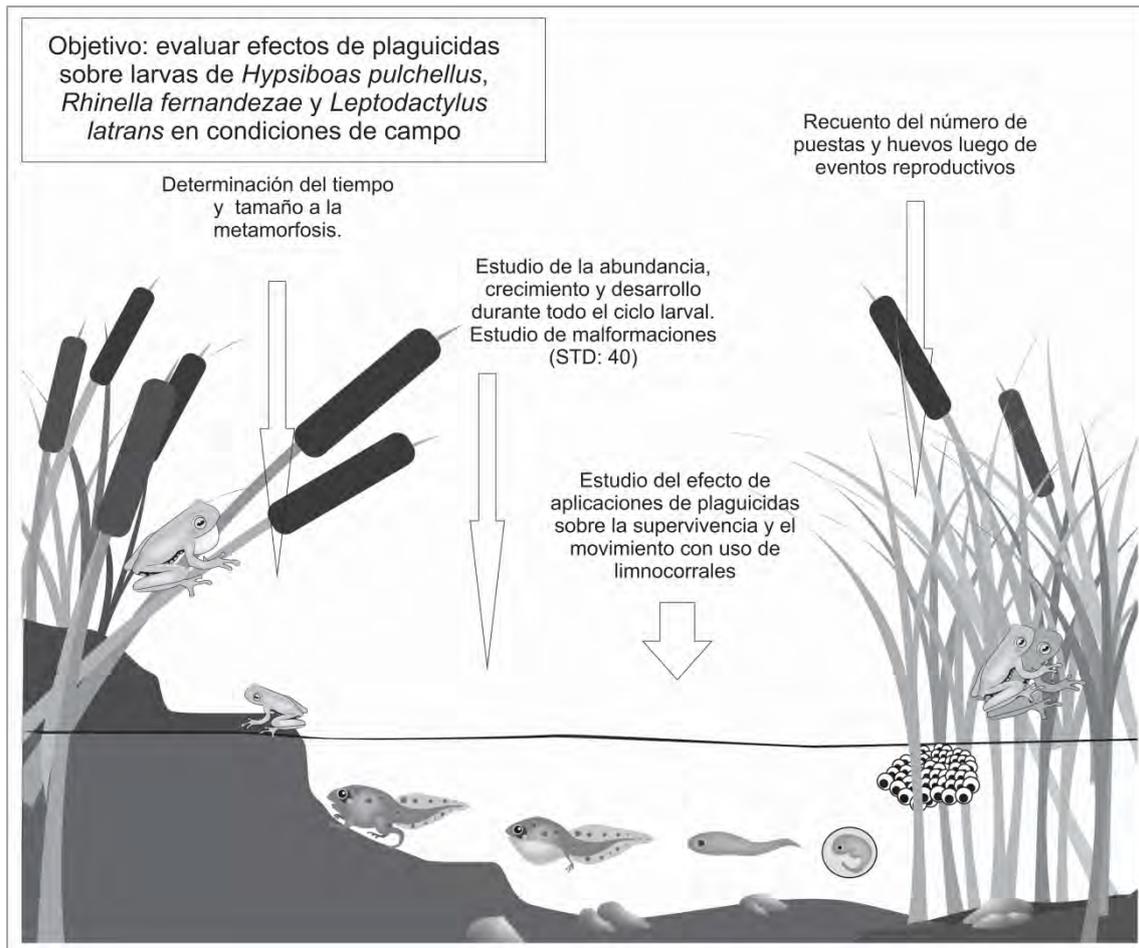


Figura 2: Esquema que representa el ciclo de vida de los anfibios anuros. Las flechas indican los puntos finales evaluados y los momentos del ciclo en que fueron muestreados.

MATERIALES Y MÉTODOS

ESPECIES ESTUDIADAS

Las especies seleccionadas para cumplir los objetivos son importantes representantes de los elencos faunísticos de los agroecosistemas de la región [96]. *H. pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans* (Fig. 3) cuentan con conspicuos períodos reproductivos, sus larvas pueden ser monitoreadas con facilidad a lo largo de todo el ciclo y son fácilmente identificables a nivel específico.



Figura 3: Especies estudiadas. **A:** ejemplar macho de *Hypsiboas pulchellus*, porción de una puesta y larva. **B:** ejemplar de *Rhinella fernandezae*, porción de la puesta y larvas. **C:** ejemplar macho de *Leptodactylus latrans*, puesta completa y larvas en estadio pre metamórfico.

ÁREA DE ESTUDIO

Fueron seleccionadas charcas situadas en los alrededores de la ciudad de La Plata (Fig. 4) que se ubican en agroecosistemas donde son llevadas a cabo actividades típicas de la región y tienen distinto grado de modificación por parte de las mismas. El sitio denominado Los Talas (LT) es un establecimiento en el cual se desarrolla cría de ganado y cultivos extensivos de soja, maíz y trigo; en el mismo se enclavan charcas temporarias dentro de los suelos destinados a ambas actividades. Fueron estudiadas tres charcas dentro del cultivo de soja y una (charca 4) ubicada dentro de los potreros. El establecimiento La Abundancia (LA) corresponde a un cultivo extensivo de soja, maíz y trigo el cual tiene dos charcas temporarias ubicadas en depresiones del terreno generados para drenar el agua de los cultivos. Ambos sitios (LT y LA) se encuentran en el Cinturón Verde Platense y aunque esta zona es predominantemente hortícola, en ambos se desarrollan cultivos extensivos. El tercer sitio estudiado corresponde al establecimiento Remes (RM) el cual también es destinado a cultivos de soja, maíz, trigo y alfalfa y cuenta con un arroyo de dimensiones pequeñas. El curso de este arroyo habitualmente se encuentra interrumpido formándose charcas temporarias donde se reproducen los anfibios [57] de las cuales dos fueron seleccionadas para este estudio. Un cuarto sitio fue considerado como sitio de referencia y corresponde al establecimiento Santa Ana (SA) el cual destina el uso del suelo a la cría de ganado vacuno, de carga mínima, para tambo. No se desarrollan en él cultivos extensivos o intensivos por lo cual las dos charcas temporarias seleccionadas para el estudio no están sometidas a la exposición directa de plaguicidas. El estudio fue conducido durante las campañas agrícolas de 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012, momento en el cual coinciden las aplicaciones de plaguicidas y la reproducción de los anfibios en el área de estudio.

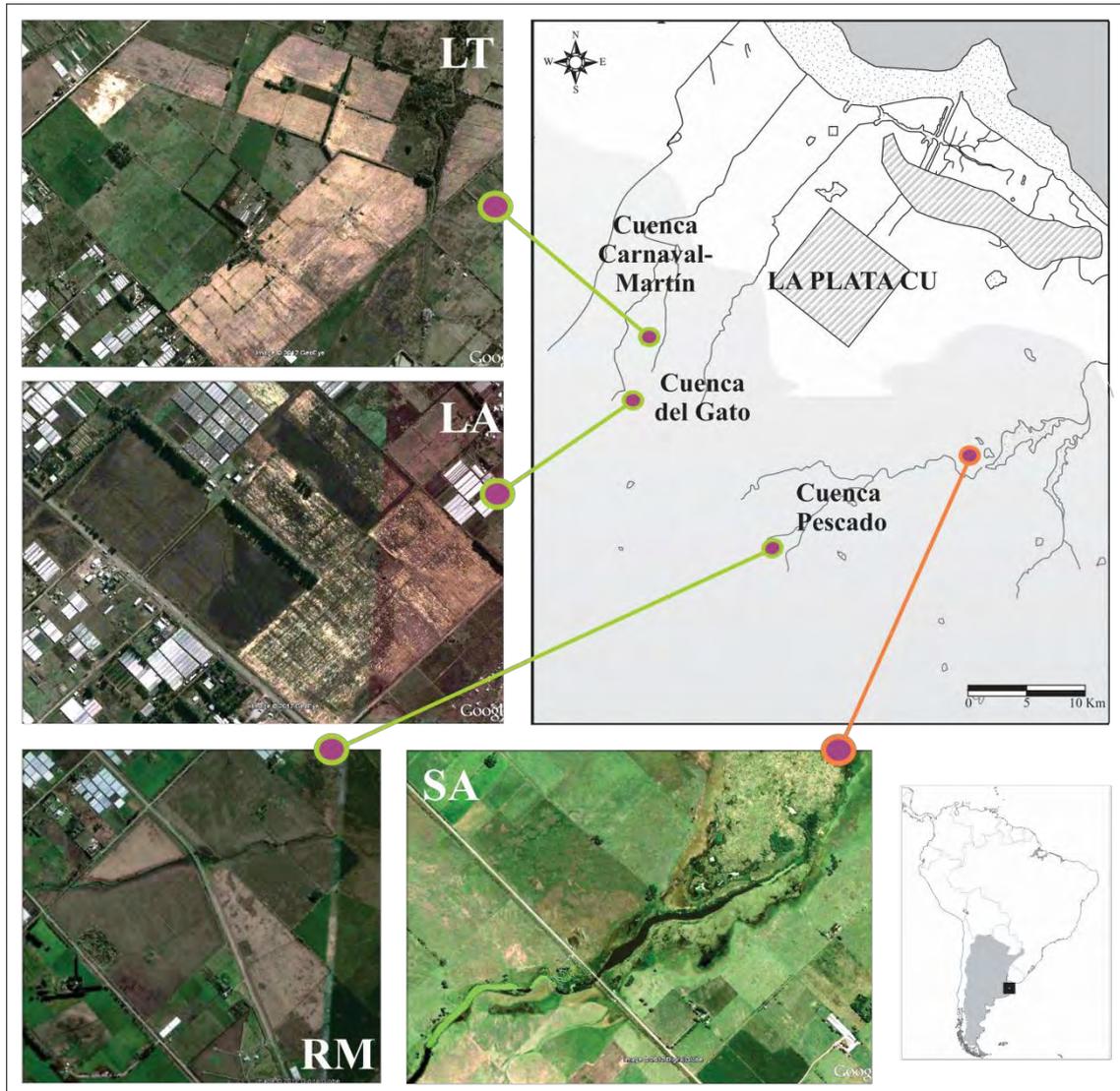


Figura 4: Área de estudio. En el mapa se detallan las zonas rurales del partido de La Plata y alrededores sombreadas en gris. Los centros urbanos más importantes se destacan con áreas rayadas. Las fotos satelitales muestran los agroecosistemas donde fue desarrollado el estudio. **LT:** establecimiento Los Talas, **LA:** establecimiento La Abundancia, **RM:** establecimiento Remes y **SA:** establecimiento Santa Ana.

EFFECTO DE LAS APLICACIONES DE PLAGUICIDAS

Para poder evaluar los efectos de los plaguicidas en campo, las aplicaciones de los mismos debieron ser coincidentes con la presencia de larvas en los cuerpos de agua. Por lo tanto, la especie en que se estudiaron los efectos dependió de que ocurrieran con antelación los pertinentes eventos reproductivos. Los momentos de aplicación fueron conocidos dado que los administradores y/o propietarios de los campos informaron

sobre las acciones relacionadas con la práctica. Todas las aplicaciones fueron realizadas con maquinaria terrestre. Para cada uno de los nueve eventos de aplicación se realizó una comparación con el sitio de referencia (SA). En la Tabla 1 se detallan los eventos de exposición y las especies estudiadas.

Tabla 1: Eventos de exposición en cada sitio de estudio, plaguicidas aplicados y estadios de desarrollo de las especies evaluadas.

Sitio	AP	Fecha	Evento de exposición	CH	Especie	STD	N
LT	1	30-10-09	CY-GLY	4	<i>Hp</i>	40-42	400
					<i>Ll</i>	41-42	600
					<i>Rf</i>	29-31	300
LT	2	22-02-10	END	2	<i>Hp</i>	36-39	200
					<i>Hp</i>	37-41	400
LT	3	05-11-10	GLY	4	<i>Hp</i>	37-41	400
LT	4	26-11-11	GLY	2	<i>Hp</i>	39-42	200
RM	5	28-02-11	CY-GLY	2	<i>Rf</i>	39-41	300
RM	6	05-10-12	CY-GLY	2	<i>Ll</i>	32-36	300
					<i>Hp</i>	39-42	200
RM	7	20-03-12	CLOR	2	<i>Ll</i>	39-42	300
LA	8	15-10-11	CY-GLY-END	1	<i>Ll</i>	30-37	150
LA	9	04-03-12	CY-GLY	2	<i>Rf</i>	39-41	300

LT: establecimiento Los Talas. **RM:** establecimiento Remes. **LA:** establecimiento La Abundancia **AP:** número de aplicación estudiada. **CLOR:** clorpirifós. **END:** endosulfán. **CY:** cipermetrina. **GLY:** glifosato. **CH:** número de charcas en las que se evaluó el efecto de aplicaciones de plaguicidas. **Hp:** *Hypsiboas pulchellus*. **Ll:** *Leptodactylus latrans*. **Rf:** *Rhinella fernandezae*. **STD:** estadio de desarrollo de larvas. **N:** número de larvas.

Previo al inicio de los estudios de campo con limnocorrales, se realizaron ensayos para determinar la posible influencia del sistema de encierro sobre las larvas. Esta etapa permitió realizar los ajustes necesarios para determinar el número de organismos por dispositivo y el tiempo de permanencia de los mismos en los limnocorrales, estableciéndose como máximo siete días de encierro.

En cada evaluación se recolectaron larvas con copos de mano de las mismas charcas en donde fueron dispuestos cinco limnocorrales de 50x20x20 cm, con red de apertura de poro de 1 mm (aproximadamente) conteniendo sedimento y agua de la

charca en que fueron situados (Fig. 5). En cada uno de ellos fueron colocadas 20 o 30 larvas (dependiendo de la especie evaluada) de estadio 27-42 [115], aproximadamente 48 h antes de cada aplicación para lograr una adecuada aclimatación. Este diseño fue implementado en cada uno de los nueve eventos, ya sea en las charcas de cultivos como en las pertenecientes al sitio de referencia.

Los limnocorrales fueron revisados aproximadamente 24 h antes de cada aplicación para constatar el estado de los organismos. Pasadas las 24 h y 48 h de cada una de ellas se realizó el recuento de individuos vivos y la determinación de las alteraciones sobre el movimiento. Fueron considerados muertos aquellos individuos en descomposición o aquellos de los que no quedaron rastros.

Las alteraciones en el movimiento se estudiaron en larvas que resultaron vivas luego de las aplicaciones. Las mismas fueron extraídas en una batea con agua de las charcas en las cuales se colocaron los limnocorrales. Luego de 5 min de aclimatación se les realizó un estímulo con una vara de madera y se observó durante 1 min la respuesta (Fig. 5c). Los estados en que se midió esta variable fueron disminución y pérdida de la natación. El primero fue definido como una natación lenta y dificultosa, mientras que en el segundo no se registraron desplazamientos pero sí temblores, convulsiones y contorsiones del cuerpo y cola.

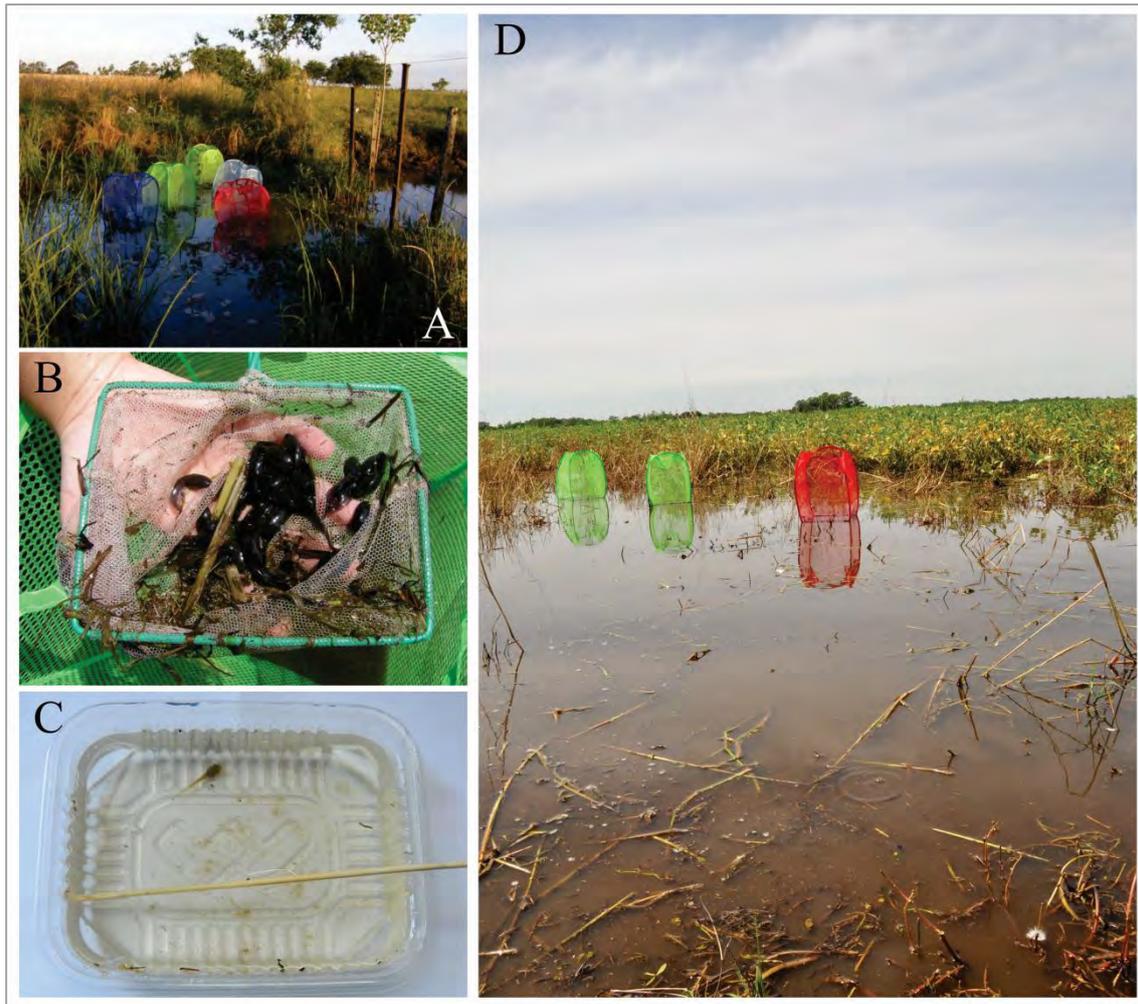


Figura 5: Evaluación de las aplicaciones de plaguicidas. **A y D:** disposición de los limnocorrales. **B:** larvas de *Leptodactylus latrans*. **C:** materiales empleados para implementar el método de evaluación de las alteraciones en el movimiento.

ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

Se monitorearon concentraciones de plaguicidas en aguas y en sedimentos de fondo. En aquellos casos en que no pudieron ser presenciadas las aplicaciones, la búsqueda de los plaguicidas fue realizada únicamente en muestras de sedimento, teniendo en cuenta la baja solubilidad en agua de los insecticidas buscados, junto a antecedentes de estudios previos en la región los cuales indican que la distribución de estos compuestos se ve favorecida en el material particulado en suspensión formador de sedimentos y en los sedimentos de fondo [77, 100, 116].

El análisis de los insecticidas clorpirifós, endosulfán y cipermetrina y el herbicida glifosato se practicó en aquellas muestras de aguas que fueron tomadas inmediatamente luego de ocurridas las aplicaciones cuando fue posible presenciar el tratamiento de los cultivos (AP1-4, AP8 y AP9). Los mismos insecticidas fueron analizados en el total de las muestras de sedimentos y la toma de muestras se realizó pasadas aproximadamente 24 h de cada evento de aplicación, momento coincidente con la lectura de los puntos finales en las larvas. Las muestras de agua para análisis de insecticidas fueron tomadas en botellas de vidrio color caramelo de 250 ml y en el caso de las muestras para análisis de glifosato se tomaron en botellas plásticas de 100 ml. Los sedimentos fueron extraídos con un *corer* y los primeros cinco centímetros de superficie fueron llevados a recipientes de vidrio o plástico con tapa dependiendo del plaguicida a determinar.

Análisis y determinación de clorpirifós, endosulfán y cipermetrina en muestras de agua: fue realizado un pretratamiento de las muestras siguiendo los métodos estandarizados propuestos por USEPA 1986. Fue realizada una extracción secuencial con diclorometano en tres pasos desde un volumen de 250 ml de muestra (ajustado a pH 4 con HCl). El extracto fue rotoevaporado y se llevó a sequedad con flujo de N₂, para luego realizar una resuspensión en n-hexano [117]. El análisis se realizó por GC-ECD (Carlo Erba, 6000), equipado con una columna HP5 (15 m con un diámetro de 0,53 mm interior), con N₂ como vehículo, y, temperaturas de rampa y detector de 190-250 °C y 320 °C respectivamente [116]. Los límites de detección fueron de 0,02 µg /l.

Análisis y determinación de glifosato y su metabolito AMPA en muestras de agua: las muestras fueron derivatizadas durante 8 h con FMOC-Cl en medio de pH=9, ajustado por un buffer borato 40mM. Los derivados GLY-FMOC, GLY 13C, 15N-FMOC y AMPA-FMOC fueron analizados por HPLC –MS con gradiente

MeOH/NH₄Ac 5mM, columna X-Select CSH C18 de 75*4,6 mm, fuente de ionización ESI, por monitoreo del ion selectivo (SIM), en modo negativo a 120 eV. Se utilizaron los iones m/z=390 ([M-H]⁻) y sus fragmentos m/z=168 y m/z=150, como iones de cuantificación y confirmación respectivamente [118]. Como criterio de calidad analítica se utilizó el método de dilución isotópica con glifosato ¹³C-¹⁵N. Los límites de detección fueron de 0,5 µg /l para cada analito.

Tanto para el clorpirifós, endosulfán y cipermetrina como para el glifosato; el pretratamiento de las muestras, los análisis cromatográficos y la interpretación de los cromatogramas fueron realizados por profesionales del CIMA en el marco del Proyecto de Investigación PICT 38350 de la ANPCyT.

Análisis y determinación de clorpirifós, endosulfán y cipermetrina en muestras de sedimentos: se realizó una extracción por sonicación en diclorometano con una relación sólido líquido 20:50, utilizando 3 contactos [119]. El procedimiento de *clean-up* se realizó con columnas de 10 g de Florisil (60-100 mesh, activated at 675 °C), eluyendo con 100 ml de mezcla hexano: éter en relaciones de 94:6, 85:15 y 50:50 [120], seguido de rotoevaporación y llevado a volumen final de 1 ml como fracción de análisis. La determinación de plaguicidas fue realizada con GC-HP Detector ECD (5890), equipada con una columna HP5 (15 mts x 530 µm x 1,50 µm), N₂ como móvil y una rampa y detector de temperaturas de 190–260 °C y 290 °C, respectivamente. Los límites de detección fueron 2 µg/kg. El procedimiento de pretratamiento y análisis de los tres insecticidas en las muestras de sedimentos fue realizado en un laboratorio de servicios externo acreditado.

Los estándares utilizados en los procedimientos de análisis fueron provistos por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).

CARACTERIZACIÓN DE LOS CUERPOS DE AGUA

En cada ocasión de muestreo fueron tomadas *in situ* las variables fisicoquímicas de los cuerpos de agua. Se midieron por triplicado pH, conductividad, oxígeno disuelto (OD) y temperatura utilizando un multiparámetro Lutron YK series 2000. Además fueron consideradas variables espaciales, estimándose la superficie de las charcas y determinándose la profundidad media. Para realizar una caracterización de la flora macrófita componente de cada charca se procedió a la asignación específica de cada planta y se asignó una escala cuantitativa que adoptó valores de 1 a 7, donde 1 representa una vegetación monoespecífica y 7 la vegetación más diversa [121].

EVENTOS REPRODUCTIVOS

Ocurrida la reproducción luego de intensas lluvias y de constatados los coros reproductivos, las charcas estudiadas fueron divididas en cuadrantes de 1x1 m en los cuales se identificó el número de puestas y posteriormente se contaron los huevos fecundados de cada una. Dado el extenso número de huevos que tienen las puestas de *L. latrans* se tomó una fracción ($\approx 10\%$) sobre la cual se contabilizaron los huevos y luego se extrapoló el número al total de la puesta. La toma de estas variables se realizó *in situ* (con posterior devolución al medio). Para lograr una adecuada comparación, los datos fueron tomados sólo en los momentos donde ocurrieron los eventos reproductivos simultáneamente en charcas de los cultivos y en las charcas del sitio de referencia, evitando que el momento de la reproducción sea considerado como variable. Cabe destacar que para el caso de la especie *R. fernandezae* no fue posible la obtención de estos datos dado que las puestas no pudieron ser identificadas por separado en la mayoría de los casos. Fueron analizados 17 eventos reproductivos entre la primavera del

2009 y el otoño de 2012. De algunos de éstos (N=8) eclosionaron las larvas que fueron estudiadas en los limnocorrales y durante los ciclos larvales.

CICLO LARVAL

Los ciclos larvales pueden durar entre 30 y 70 días dependiendo de la especie y las condiciones ambientales. Teniendo en cuenta antecedentes de efectos adversos asociados a la clausura de organismos en limnocorrales luego de pasados siete días, se optó por estudiar el ciclo larval en individuos de vida libre. Una vez eclosionadas las larvas se realizaron muestreos semanales estratificados con reposición [122], hasta el día en que fueron observados los primeros individuos metamórficos. Esto se realizó en las mismas charcas y sitios en los que fueron colocados los limnocorrales y todos los ciclos estudiados en cultivos contaron con exposición a plaguicidas. Los puntos finales evaluados durante el transcurso del ciclo larval fueron: abundancia, crecimiento, desarrollo y tiempo y tamaño a la metamorfosis. Fue estudiado además el desarrollo de anomalías.

Para estudiar la abundancia, cada charca fue dividida en cuadrantes de 1x1 m y en 20 de ellos seleccionados al azar se pasaron copos de mano, contabilizando el número de larvas. El crecimiento fue estudiado en larvas (N=50 por ocasión de muestreo en cada charca) escogidas al azar cuando se realizaban los muestreos de abundancia, las cuales fueron extraídas de las charcas y luego de efectuarse las mediciones fueron regresadas al medio. El crecimiento se expresó como la longitud del cuerpo (LC) utilizando un calibre digital Svhwys 0,01 mm. Fueron determinados los estadios de desarrollo [115] con una lupa Leica ES2. En cada ocasión de muestreo fueron seleccionadas larvas en estadio 40 de desarrollo en las cuales se prospectaron anomalías empleando una lupa Leica ES2. Las anomalías fueron determinadas

en un total de 50 larvas por charca y por ciclo, siguiendo las categorías propuestas por Bantle *et al.* [123].

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar el efecto de las aplicaciones sobre la supervivencia de larvas se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) [124, 125] con distribución de error de Poisson y función de enlace *log*. Los limnocorrales fueron tomados como efectos aleatorios. Dentro de los efectos fijos fueron considerados: la especie, las charcas y las horas transcurridas desde la aplicación (24 h antes, 24 y 48 h después). El análisis de los efectos en el movimiento se llevó a cabo con MLGM que incluyeron los mismos efectos aleatorios y fijos utilizados para evaluar cambios en la supervivencia, aunque en este caso la variable de respuesta analizada fue la alteración en el movimiento. Fue realizado un MLGM por cada aplicación.

Interesa analizar las diferencias entre las charcas estudiadas a partir de las variables de caracterización de las mismas (pH, conductividad, OD y temperatura) y si estas variables fluctúan respecto del momento de la aplicación. Para ello se utilizaron modelos lineales generales mixtos (MLGrM) [126, 127]. El tiempo respecto de la exposición (24 h antes, 24 y 48 h después de cada evento) y el uso de la tierra en el cuál se encontraban las charcas (sitios cultivados y de referencia) fueron considerados como efectos fijos, mientras que cada aplicación se consideró como un efecto aleatorio. Se realizó un modelo lineal general mixto por cada variable.

Las diferencias en el número de puestas entre charcas de cultivos y charcas de referencia se analizaron con una prueba de *t* pareada, tomando como pares los eventos reproductivos. Dado que el número de charcas ubicadas en los cultivos y en los sitios de referencia difieren en número, la variable de respuesta se relativizó a la cantidad de

charcas muestreadas en ambos tratamientos. Las diferencias en el número de huevos entre charcas de cultivos y charcas de referencia fueron analizadas con prueba de *t* para cada especie. Ambas variables fueron transformadas con $\text{Log}(X+1)$ y en cada análisis se corroboraron los supuestos teóricos estadísticos para su aplicación.

A pesar de haber evaluado el efecto sobre la supervivencia con limnocorrales, resulta importante comprobar si los mismos se ven reflejados en las poblaciones larvales estudiadas. Para examinar diferencias en las abundancias 24 h antes y 48 h después de cada aplicación en cada charca se implementaron modelos lineales generalizados (MLG) [127] con distribución de error Poisson y función de enlace *log*. La charca y el momento respecto de la aplicación (24 h antes y 48 h después) fueron considerados efectos fijos. Fue realizado un MLG por aplicación.

El crecimiento expresado como longitud del cuerpo (LC), fue evaluado a partir de curvas de crecimiento y modelos no lineales. Para ello fue evaluado el ajuste a los siguientes modelos: Gompertz, $Y = A \exp(-B \exp(-Kt))$; Logístico, $Y = A / (1 + B \exp(-Kt))$ y Von Bertalanffy, $Y = A (1 - B \exp(-Kt))^3$. La selección del mejor ajuste se realizó implementando el criterio de información de Akaike (AIC). Los parámetros usados en estos modelos se definen como “Y” = longitud del cuerpo (cm); “t” = edad; “A” = longitud del cuerpo al tiempo de maduración; “K” = tasa de crecimiento al tiempo de la maduración y finalmente “B” representa un parámetro de escala para los modelos y no tiene significado biológico. Una vez seleccionado el mejor modelo se procedió a evaluar las diferencias entre los parámetros “A” y “K” de la curva seleccionada, correspondientes a ciclos cumplidos en charcas de cultivos y charcas de referencia.

Las anomalías en larvas de estadio 40 de cada especie estudiada por cada charca fueron expresadas como prevalencias que corresponden al *n* individuos

anormales/ n de individuos muestreados. Una vez distinguidos los tipos de anomalías ocurridos en charcas de cultivos y control, se utilizaron tablas de contingencia (una para cada especie) para explorar si la prevalencia de anomalías es dependiente de las charcas ubicadas en los cultivos y en los sitios de referencia. Estos análisis fueron conducidos sobre los valores de prevalencias totales de cada población, sin distinguir tipos de anomalías.

En los análisis en que se implementaron MLG, MLGrM y MLGM se utilizó el procedimiento de selección *backward*, por medio del cual se removieron los términos no significativos de cada modelo uno por uno, en orden decreciente de nivel de interacción y en orden decreciente de p en el caso de tratarse del mismo nivel [127]. En caso de haber sido incluidos en los análisis efectos aleatorios, su significancia fue evaluada con un test de verosimilitud (*likelihood test*) [125].

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa R, Versión 2.15.1 (R Development Core Team 2012) y los paquetes adicionales *nlme* [128] y *lme4* [129]. Las tablas de contingencia fueron analizadas con Statistica V.8. Todas las pruebas estadísticas contemplaron análisis a dos colas, con un nivel de significancia $p < 0,05$.

RESULTADOS

EFECTO DE LAS APLICACIONES DE PLAGUICIDAS

En cada una de las evaluaciones de toxicidad la variación aportada por el efecto de los limnocorrales no fue significativa ($p > 0,05$) por lo cual pudieron ser considerados como réplicas. Los resultados de las exposiciones en los limnocorrales muestran que de las nueve aplicaciones evaluadas, seis generaron una disminución significativa ($p < 0,05$) en la supervivencia de larvas de las tres especies estudiadas. Estas disminuciones se

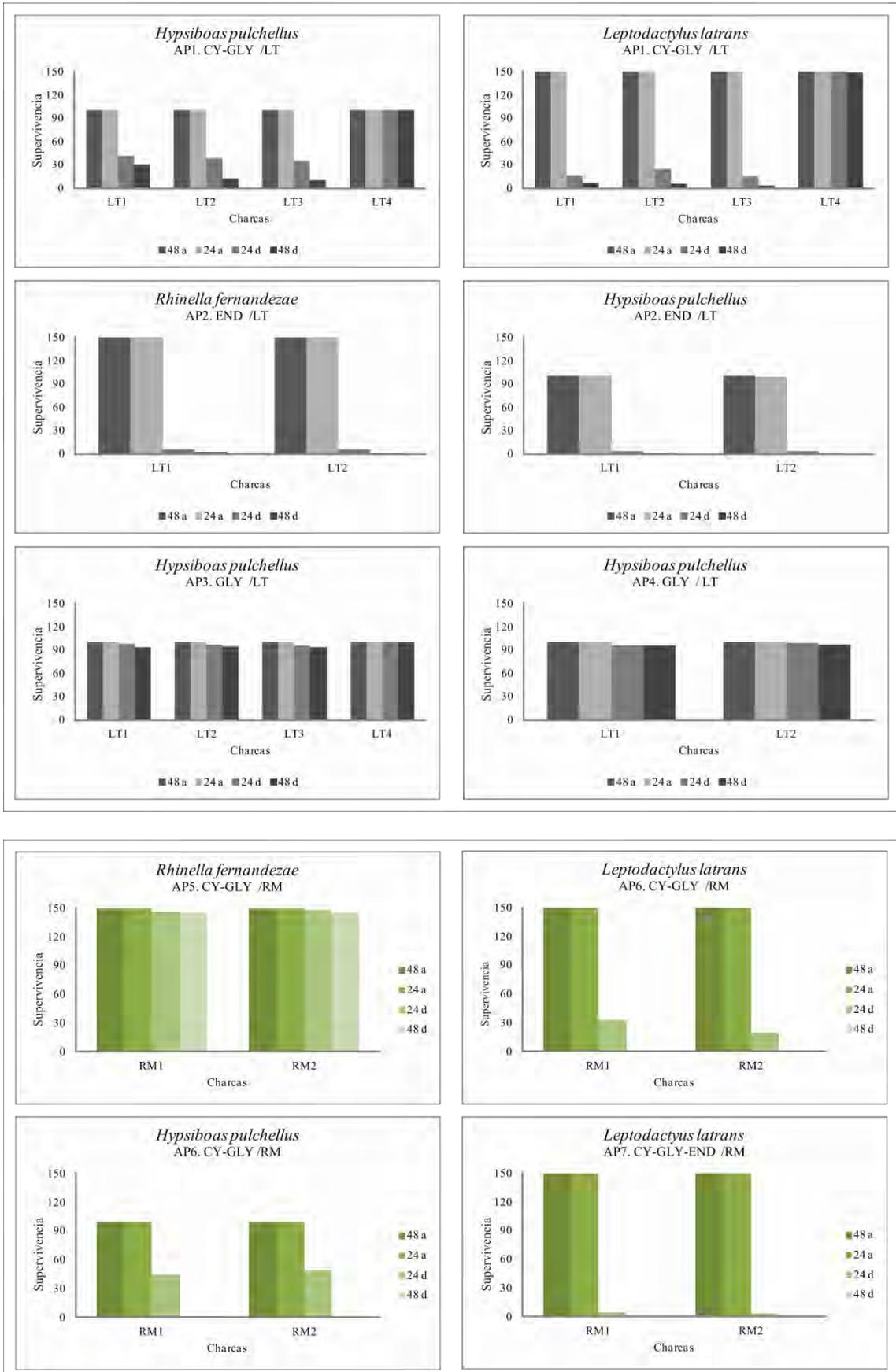
asociaron a las siguientes aplicaciones: AP1, 6 y 9 de CY-GLY, AP2 de END, AP7 de CLOR y AP8 de CY-GLY-END.

En la AP1 la supervivencia de larvas de *L. latrans* fue significativamente inferior que en *H. pulchellus* ($Z = -4,68$; $p < 0,05$) así como también el efecto sobre la supervivencia fue significativamente mayor a las 48 h ($Z = -3,61$; $p < 0,05$). En la AP 2 no hubo diferencias significativas entre la supervivencia de las especies expuestas ($Z = -2,33$; $p = 0,06$) ni tampoco entre las 24 y 48 h de transcurrida la aplicación ($Z = -1,40$; $p = 0,33$). Respecto de la aplicación AP6 se registraron descensos significativos en la supervivencia entre las 24 y 48 h ocurrida la aplicación ($Z = -5,24$; $p < 0,05$) mientras la diferencia en la supervivencia entre las dos especies evaluadas no fue significativa ($Z = 0,87$; $p = 0,38$). No fueron detectadas diferencias significativas entre las supervivencias a las 24 y 48 h de ocurridas las aplicaciones AP7 ($Z = -0,67$; $p = 0,77$) y AP8 ($Z = -0,91$; $p = 0,63$) mientras que sí lo fueron para la aplicación AP9 ($Z = -2,55$; $p < 0,05$). La Tabla 2 y la Figura 6 resumen los valores de supervivencia en cada una de las aplicaciones evaluadas y los resultados de las determinaciones de plaguicidas en muestras de agua tomadas inmediatamente luego de ocurridas las aplicaciones. Cabe destacar que no fueron observados efectos en las charcas de referencia ni detectado plaguicidas en muestras de agua y sedimento por lo que no fueron incorporados a las tablas y figuras.

Tabla 2: Porcentaje de supervivencia en larvas de charcas aplicadas y concentraciones de plaguicidas detectados en muestras agua tomadas inmediatamente luego de la aplicación.

Aplicación	Especie	Charca	Tiempo desde la aplicación			µg/L
			24 h A	24 h D	48 h D	
AP1 CY-GLY	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	LT1	100	42*	31*	CY 203,4 - GLY 153,5
		LT2	100	39*	13*	CY 195,3 - GLY 231,2
		LT3	100	35*	10*	CY 365,2 - GLY 193,5
		LT4	99	99	99	CY < 0,02 - GLY < 0,5
	<i>Leptodactylus latrans</i>	LT1	100	11*	4*	CY 203,4 - GLY 153,5
		LT2	100	16*	4*	CY 195,3 - GLY 231,2
		LT3	100	10*	2*	CY 365,2 - GLY 193,5
		LT4	100	100	100	CY < 0,02 - GLY < 0,5
AP2 END	<i>Rhinella fernandezae</i>	LT1	100	4*	1*	END 242,9
		LT2	100	4*	1*	END 327,5
	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	LT1	100	4*	1*	END 242,9
		LT2	100	3*	0*	END 327,5
AP3 GLY	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	LT1	99	98	97	GLY 143,7
		LT2	100	97	95	GLY 110,5
		LT3	100	98	98	GLY 179,3
		LT4	100	99	99	GLY < 0,5
AP4 GLY	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	LT1	99	96	96	GLY 92,5
		LT2	100	99	98	GLY 54,32
AP5 CY-GLY	<i>Rhinella fernandezae</i>	RM1	100	97	96	CY 3,9 – GLY < 0,5
		RM2	100	98	97	CY < 0,02 - GLY < 0,5
AP6 CY-GLY	<i>Leptodactylus latrans</i>	RM1	100	35*	2*	NA
		RM2	100	20*	0*	NA
	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	RM1	100	36*	3*	NA
		RM2	100	36*	2*	NA
AP7 CLOR	<i>Leptodactylus latrans</i>	RM1	100	2*	0*	NA
		RM2	100	3*	0*	NA
AP8 CY-GLY- END	<i>Leptodactylus latrans</i>	LA1	100	14	3	CY 45,6 - GLY < 0,5 - END 230,3
AP9 CY-GLY	<i>Rhinella fernandezae</i>	LA1	99	28*	3*	CY 184,5 - GLY 35,7
		LA2	100	32*	2*	CY 149,5 - GLY 18,2

AP: número de aplicación estudiada. **CLOR:** clorpirifós. **END:** endosulfán. **CY:** cipermetrina. **GLY:** glifosato. **LT:** establecimiento Los Talas. **RM:** establecimiento Remes. **LA:** establecimiento La Abundancia. *indica diferencias significativas en la supervivencia antes y después de la aplicación. **NA:** muestras no analizadas.



Continúa en página 37

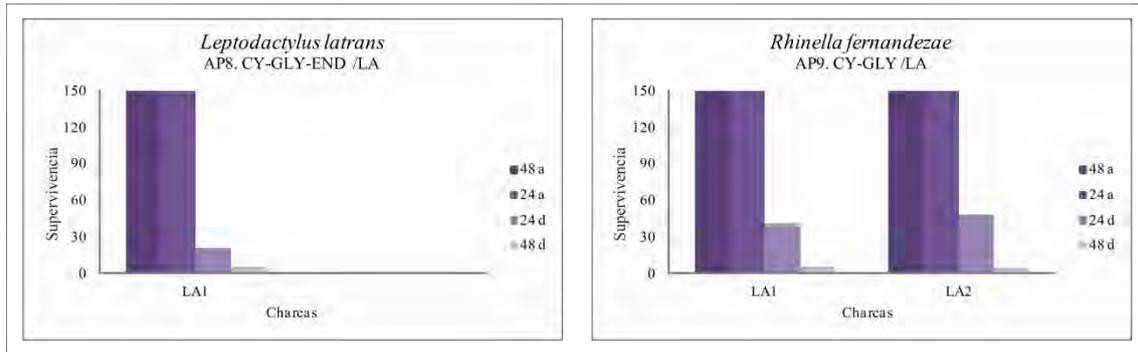


Figura 6: Supervivencia de larvas en limnocorrales de cada aplicación evaluada y las horas respecto de la aplicación. **AP:** número de aplicación estudiada. **CLOR:** clorpirifós. **END:** endosulfán. **CY:** cipermetrina. **GLY:** glifosato. **LT:** establecimiento Los Talas representado con barras color gris. **RM:** establecimiento Remes representado con barras color verde. **LA:** establecimiento La Abundancia representado con barras color violeta.

Las alteraciones en el movimiento no pudieron ser analizadas en las aplicaciones AP1 para *L. latrans*, AP2, AP6 para *L. latrans*, AP7, AP8 y AP9 dado que la cantidad de individuos vivos no fue suficiente para realizar un adecuado análisis estadístico. Los resultados indican una pérdida significativa del movimiento ya sea por reducción en la natación o por inmovilidad en cuatro de las cinco aplicaciones evaluadas (Tabla 3). Estos efectos no fueron significativos luego de la aplicación AP5.

En la aplicación AP1 de CY-GLY hubo diferencias significativas en el número de individuos afectados de *H. pulchellus* respecto del tiempo de la aplicación, siendo superior a las 48 hs ($Z = -2,21; p < 0,05$). Estas diferencias no fueron significativas en la aplicación AP5 de CY-GLY, ($Z = -0,84; p = 0,69$), mientras que para la evaluación de la misma mezcla en AP6 no pudo evaluarse esta diferencia dado el bajo número de individuos que sobrevivieron a las 48 h de exposición. Las dos evaluaciones de aplicación de GLY mostraron diferencias significativas en el número de individuos afectados respecto del tiempo de la aplicación siendo superior a las 48 hs: AP3 ($Z = -1,96; p < 0,05$) y AP4 ($Z = -2,05; p < 0,05$). En ninguna de las evaluaciones se registraron ni pérdida de movimiento significativas asociadas a los limnocorrales colocados en las charcas de referencia.

Tabla 3: Porcentaje de larvas que presentaron efectos sobre el movimiento en las charcas que recibieron aplicaciones de plaguicidas.

Aplicación	Especie	Charca	Tiempo desde la aplicación			
			N 24h	%	N 48h	%
AP1 CY-GLY	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	LT1	42	56*	31	88*
		LT2	39	57*	13	95*
		LT3	35	69*	10	83*
		LT4	99	0	99	1
AP3 GLY	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	LT1	98	34	94	80*
		LT2	97	69*	95	96*
		LT3	96	54*	94	89*
		LT4	100	1	99	0
AP4 GLY	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	LT1	96	69*	96	95*
		LT2	99	34	97	64*
AP5 CY-GLY	<i>Rhinella fernandezae</i>	RM1	146	1	145	2
		RM2	148	2	245	3
AP6 CY-GLY	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	RM1	45	100*	2	NE
		RM2	49	89*	0	NE

AP: número de aplicación estudiada. **CLOR:** clorpirifós. **END:** endosulfán. **CY:** cipermetrina. **GLY:** glifosato. **LT:** charcas del establecimiento Los Talas. **RM:** charcas del establecimiento Remes. **N 24h:** número de larvas sobrevivientes a las 24 h de ocurrida la aplicación. **N 48h:** número de larvas sobrevivientes a las 48 h de ocurrida la aplicación. *indica diferencias significativas en el número de individuos afectados antes y después de la aplicación. **NE:** efecto no evaluado

ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

Las mediciones de plaguicidas que fueron realizadas sobre muestras tomadas inmediatamente luego de las aplicaciones se muestran en la Tabla 2 junto a los efectos evaluados. Las detecciones de insecticidas en sedimento pasadas las 24 h de todas las aplicaciones se muestran en la Tabla 4 de la cual se desprende que en varias oportunidades fueron detectados los insecticidas clorpirifós y endosulfán sin aplicaciones previas inmediatas, en general las concentraciones de estos plaguicidas fueron menores que cuando se detectaron en asociación a aplicaciones previas (24 h antes).

Tabla 4: Concentraciones de insecticidas en sedimentos de charcas que recibieron las aplicaciones de plaguicidas. Las muestras fueron tomadas 24 h después de cada aplicación.

AP	Charca	Sedimento µg/Kg		
		CY	END	CLOR
AP1 CY-GLY	LT 1	32,4	5,1	< 2
	LT 2	29,8	4,3	5,7
	LT 3	43,7	3,9	4,2
	LT 4	< 2	1,5	< 2
AP2 END	LT 1	< 2	87,3	< 2
	LT 2	< 2	74,9	5,5
AP3 GLY	LT 1	< 2	2,3	< 2
	LT 2	< 2	1,5	3,1
	LT 3	< 2	1,2	1,3
	LT 4	< 2	2,6	< 2
AP4 GLY	LT 1	< 2	2,4	2,9
	LT 2	< 2	1,2	< 2
AP5 CY-GLY	RM 1	< 2	2,1	< 2
	RM 2	< 2	< 2	< 2
AP6 CY-GLY	RM 1	20,6	4,9	< 2
	RM 2	12,8	< 2	< 2
AP7 CLOR	LA 1	2,7	1,5	12,4
	LA 2	5,4	< 2	17,2
AP8 CY-GLY-END	LA 2	67,3	39,5	3,7
AP9 CY-GLY	LA 1	73,2	3,2	3,3
	LA 2	54,9	1,8	3,1

AP: número de aplicación estudiada. **CY:** cipermetrina. **GLY:** glifosato. **END:** endosulfán. **LT:** establecimiento Los Talas. **RM:** establecimiento Remes. **LA:** establecimiento La Abundancia. – no detectado. Las concentraciones se refieren a masa seca de sedimento.

CARACTERIZACIÓN DE LOS CUERPOS DE AGUA

Los resultados muestran que no hubo efecto significativo de las aplicaciones sobre ninguno de los parámetros evaluados (Tablas 5 a 8). Ninguna de las variables estudiadas mostró diferencias entre las charcas exceptuando el OD cuyos valores fueron significativamente altos en charcas del sitio de referencia (Tabla 7). No se registró efecto significativo de las aplicaciones sobre ninguno de los modelos. Los resultados de los parámetros fisicoquímicos y morfométricos y los valores de riqueza de macrófitas de las charcas estudiadas se muestran en la Tabla 9.

Tabla 5: Modelo lineal general mixto para el pH de charcas cultivadas y de referencia.

Efectos	F-test	P
Fijos		
Intercepto	$F_{1,435} = 25,39$	< 0,001
Tiempo desde la aplicación	$F_{2,341} = 2,64$	= 0,07
Uso de la tierra	$F_{1,217} = 1,88$	= 0,15

Tabla 6: Modelo lineal general mixto para la conductividad de charcas cultivadas y de referencia.

Efectos	F-test	P
Fijos		
Intercepto	$F_{1,435} = 18,50$	< 0,001
Tiempo desde la aplicación	$F_{2,341} = 2,13$	= 0,12
Uso de la tierra	$F_{1,217} = 1,55$	= 0,22

Tabla 7: Modelo lineal general mixto para el OD de charcas cultivadas y de referencia.

Efectos	F-test	P
Fijos		
Intercepto	$F_{1,435} = 26,08$	< 0,001
Tiempo desde la aplicación	$F_{2,341} = 1,39$	= 0,22
Uso de la tierra	$F_{1,217} = 8,43$	= 0,004

Tabla 8: Modelo lineal general mixto para la temperatura de charcas cultivadas y de referencia.

Efectos	F-test	P
Fijos		
Intercepto	$F_{1,435} = 15,08$	< 0,001
Tiempo desde la aplicación	$F_{2,341} = 1,08$	= 0,34
Uso de la tierra	$F_{1,217} = 0,81$	= 0,37

Tabla 9: Valores medios y desvíos estándar (entre paréntesis) de los parámetros que caracterizan las charcas estudiadas.

Charca	N	pH	OD (mg/L)	Conductividad (mS/cm)	T (°C)	Area (m ²)	Profundidad (cm)	R
LT 1	36	7,18 (0,29)	9,38 (1,12)	0,21 (0,10)	19,9 (1,9)	157,4 (56,6)	43,4 (12,3)	1
LT 2	36	7,03 (0,26)	9,12 (1,25)	0,19 (0,11)	19,9 (2,6)	135,2 (40,5)	50,3 (9,3)	2
LT 3	18	7,16 (0,25)	9,23 (1,22)	0,18 (0,05)	20,9 (1,4)	166,5 (49,7)	46,7 (12,6)	1
LT 4	18	6,98 (0,35)	10,46 (1,38)	0,19 (0,08)	19,1 (3,1)	170,8 (51,5)	48,4 (15,2)	4
RM 1	27	7,09 (0,32)	9,03 (2,12)	0,21 (0,11)	21,8 (2,5)	80,2 (47,1)	57,9 (19,6)	2
RM 2	27	7,21 (0,21)	9,51 (2,42)	0,20 (0,11)	20,7 (2,4)	98,0 (53,8)	57,9 (11,4)	3
LA 1	9	7,12 (0,35)	9,02 (1,28)	0,17 (0,12)	21,9 (2,3)	94,2 (37,5)	42,3 (16,2)	1
LA 2	18	6,98 (0,24)	9,08 (1,05)	0,16 (0,09)	22,0 (1,3)	96,0 (27,8)	65,3 (12,4)	1
SA 1	81	6,94 (0,31)	11,17 (1,32)	0,17 (0,12)	19,7 (2,4)	103,5 (28,6)	47,1 (12,8)	7
SA 2	81	6,99 (0,25)	11,31 (1,21)	0,12 (0,14)	19,7 (2,9)	95,9 (32,8)	45,4 (10,7)	6

N: número de muestras por parámetro. **LT:** establecimiento Los Talas, **RM:** establecimiento Remes, **LA:** establecimiento La Abundancia, **SA:** establecimiento Santa Ana, **T:** temperatura, **R:** riqueza de especies de macrófitas.

EVENTOS REPRODUCTIVOS

Los resultados del número de puestas y el número de huevos fecundados para los 17 eventos reproductivos se detallan en la Tabla 10. El número de puestas en las charcas de referencia fue significativamente mayor que en las charcas con cultivos ($t = 16,17$; $df = 16$; $p < 0,05$) aunque el número de huevos fecundados no difirió significativamente entre charcas para las especies *L. latrans* ($t = -0,26$; $df = 143$; $p = 0,79$) e *H. pulchellus* ($t = -1,18$; $df = 538$; $p = 0,23$). Resulta notable que en la charca número 4 del sitio Los Talas el número de puestas fue superior que el registrado en las demás charcas del mismo agroecosistema.

Tabla 10: Eventos de reproducción de las especies estudiadas. Se indica la fecha, el número de puestas y el número promedio de huevos y sus desvíos.

	SA 1	SA 2	LT 1	LT 2	LT 3	LT 4
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (03-09-09) AP 1						
Puestas	13	29	4	4	7	20
Huevos	369,9 (48,4)	328,9 (46,8)	396,5 (86,1)	397,8 (30,2)	372,8 (45,8)	367,9 (44,3)
<i>Leptodactylus latrans</i> (10-10-09) AP 1						
Puestas	7	10	1	3	4	12
Huevos	4723,3 (189,0)	4716,5 (483,9)	3978*	4769,2 (272,1)	4643,7 (459,2)	4783,1 (335,9)
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (15-11-09)†						
Puestas	13	21	5	4	10	NR
Huevos	321,3 (46,7)	350,8 (59,3)	341,1 (45,0)	346,5 (49,7)	312,9 (69,3)	NR
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (29-01-10) AP 2						
Puestas	12	25	6	11	NR	NR
Huevos	371,5 (36,9)	391,2 (53,8)	326,6 (35,2)	388,8 (40,7)		
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (19-02-10) †						
Puestas	9	14	3	4	NR	NR
Huevos	340,3 (41,9)	309,2 (63,3)	315,5 (45,1)	333,8 (43,2)		
<i>Leptodactylus latrans</i> (20-02-10) †						
Puestas	6	14	2	3		
Huevos	4809,2 (211,2)	4694,3 (358,3)	4076*	4715,5 (413,8)	NR	NR
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (28-09-10) AP 3						
Puestas	10	23	1	5	9	10
Huevos	359,6 (49,6)	384,9 (51,4)	478*	386,6 (48,0)	372,9 (39,8)	375,4 (44,9)
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (12-09-11) AP 4						
Puestas	14	21	6	4		
Huevos	375,4 (42,7)	360,9 (41,4)	351,3 (40,2)	367,5 (45,8)		

Continúa en página 43

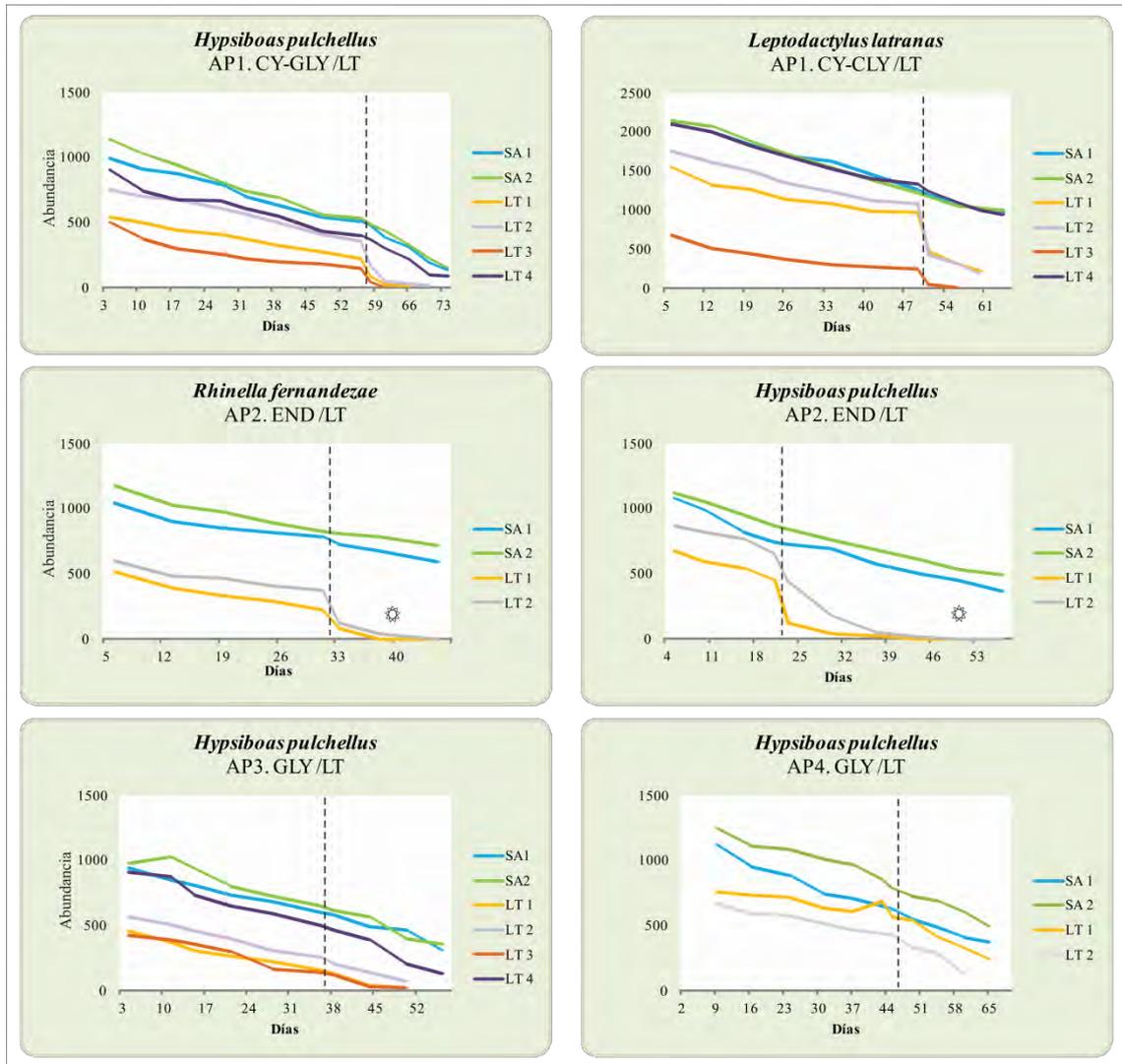
Viene de página 42						
	SA 1	SA 2	LT 1	LT 2	LT 3	LT 4
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (13-02-12) †						
Puestas	21	34	4	4	3	NR
Huevos	342,9 (64,9)	356,0 (43,8)	362,2 (53,0)	373,9 (54,5)	385,6 (46,9)	
<i>Leptodactylus latrans</i> (15-02-212) †						
Puestas	9	10	3	3		
Huevos	4741,1 (246,1)	4738 (316,3)	4872,2 (305,7)	4725,6 (423,1)	NR	NR
	SA 1	SA 2	RM 1	RM 2		
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (15-02-10) †						
Puestas	11	22	5	4		
Huevos	365,5 (57,3)	357,8 (49,1)	377,4 (50,0)	363,2 (51,9)		
<i>Leptodactylus latrans</i> (15-02-10) †						
Puestas		11	3	4		
Huevos		4705,0 (279,1)	4868,6 (298,6)	4680,4 (333,9)		
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (30-08-10) AP 6						
Puestas	14	21	6	4		
Huevos	375,4 (42,7)	360,9 (41,4)	351,3 (40,2)	367,5 (45,8)		
<i>Leptodactylus latrans</i> (30-08-11) AP 6						
Puestas	11	15	2	2		
Huevos	4643,5 (514,5)	4608,8 (526,2)	4665,9*	5037 *		
<i>Leptodactylus latrans</i> (14-02-12) †						
Puestas	7	18	3	4		
Huevos	4768,2 (445,8)	4387,7 (565,1)	4512,4 (492,3)	4918,2 (481,3)		
	SA 1	SA 2	LA 1	LA 2		
<i>Leptodactylus latrans</i> (03-09-11) AP 8						
Puestas	7	NR	3	NR		
Huevos	4603,4 (266,3)		4593,5 (449,2)			
<i>Leptodactylus latrans</i> (09-01-12) †						
Puestas	6	12	3	2		
Huevos	4478,1 (513,8)	4398,2 (355,6)	4461,4 (467,7)	4428,8 *		

SA: charcas del establecimiento Santa Ana. LT: charcas del establecimiento Los Talas. RM: charcas del establecimiento Remes. LA: charcas del establecimiento La Abundancia. NR: indica que no hubo reproducción en esa charca. AP: indica la evaluación de aplicación de plaguicidas durante el ciclo larval (ver Tabla 1) durante su ciclo. † Ciclos que no tuvieron evaluación de aplicación de plaguicidas. * Promedios en los que no pudieron calcularse los desvíos.

CICLO LARVAL

Los resultados sobre las abundancias larvales registraron que los eventos de aplicación evaluados producen un descenso significativo en la variable de respuesta a las 48 h de exposición en seis de las nueve aplicaciones evaluadas (Fig. 7). Un test *a posteriori* de X^2 mostró que no hubo efectos de la aplicación AP1 (CY-GLY) en la charca número 4 ($X^2 = 10,11$; $df = 5$; $N = 500$; $p = 0,072$). Ambas aplicaciones de GLY y una aplicación de CY-GLY no mostraron efectos sobre la abundancia y corresponden a AP3 ($X^2 = 9,833$; $df = 5$; $N = 500$, $p = 0,08$), AP4 ($X^2 = 4,89$; $df = 3$; $N = 250$, $p = 0,18$) y AP5 ($X^2 = 5,83$; $df = 3$; $N = 500$; $p = 0,12$) respectivamente.

Resulta de interés señalar que bajo todas las aplicaciones que contuvieron END, CLOR y la AP6 de CY-GLY los ciclos larvales no se completaron (Fig. 7). Esto se evidenció en los muestreos de abundancia en los cuales no se registraron larvas en los últimos estadios de desarrollo, y en los cuales tampoco fueron observados individuos metamórficos.



Continúa en página 45

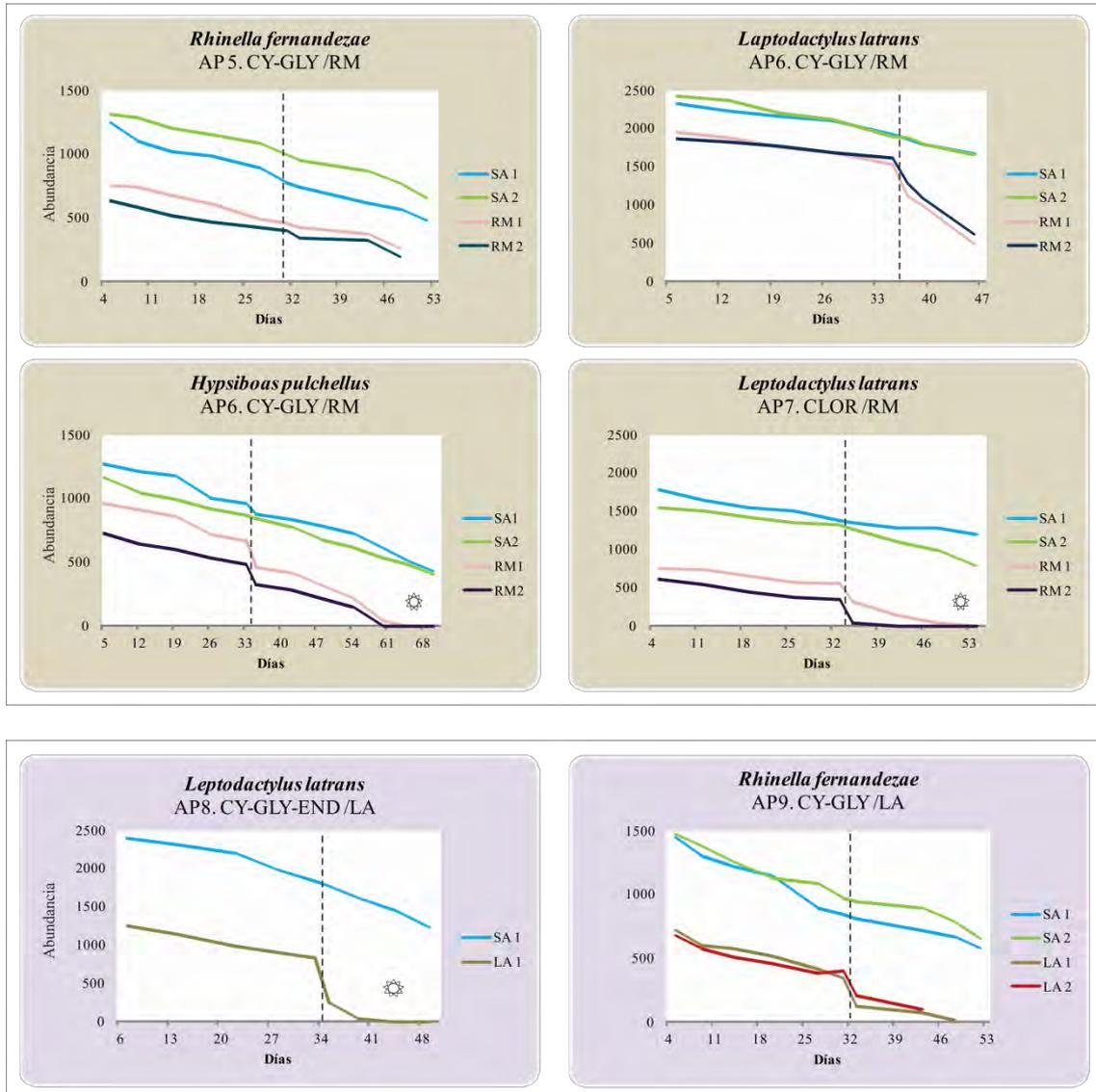


Figura 7: Abundancias en relación a la edad en días de larvas. **AP:** número de aplicación estudiada. **CLOR:** clorpirifós. **END:** endosulfán. **CY:** cipermetrina. **GLY:** glifosato. **SA:** establecimiento Santa Ana representado en gráficos color celeste. **LT:** establecimiento Los Talas representado en gráficos color rosado. **RM:** establecimiento Remes representado en gráficos color violeta. **LA:** establecimiento La Abundancia. Las líneas punteadas representan el día de la aplicación en las chacras de cultivos. ☞ Representa los ciclos que no culminaron en metamorfosis

El modelo que mejor explicó el crecimiento larval de *H. pulchellus* y *R. fernandezae* fue el de Gompertz, mientras que el mejor ajuste para el crecimiento de larvas de *L. latrans* fue logrado con la ecuación de Von Bertalanffy, aunque los valores de distancia con el modelo de Gompertz fueron altamente similares (Tabla 11). Por esta razón fue utilizado el modelo de Gompertz para realizar los análisis en las tres especies estudiadas a fin de lograr adecuadas comparaciones. Los análisis de las curvas de

crecimiento modeladas muestran que las larvas de *H. pulchellus* y *R. fernandezae* de los sitios cultivados tienen significativamente menores tamaños (A) y mayor tasa de crecimiento (K) (Tabla 12). Respecto a las larvas de *L. latrans* no fueron halladas diferencias significativas entre la tasa de crecimiento de larvas expuestas (K) aunque estas sí tuvieron tamaños (A) significativamente menores (Tabla 12).

Tabla 11: Comparación de modelos no-lineales aplicados para describir el crecimiento larval en las tres especies estudiadas.

Especie	Modelo	df	AIC
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	Gompertz	9	9437,2
	Von Bertalanffy	9	9441,5
	Logística	9	9472,8
<i>Leptodactylus latrans</i>	Von Bertalanffy	9	7211,7
	Gompertz	9	7211,8
	Logística	9	7226,5
<i>Rhinella fernandezae</i>	Gompertz	7	9018,5
	Von Bertalanffy	7	9026,3
	Logística	7	9031,7

df: grados de libertad del modelo. AIC: criterio de información de Akaike.

Tabla 12: Parámetros y sus desvíos estimados por curvas de Gompertz en larvas de ciclos en charcas expuestas a plaguicidas y de referencia.

Especie	Charcas	A	t (p)	K	t (p)
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	Cultivos	18,53	$t = 61,14; df = 550$	0,021	$t = 23,07; df = 550$
	Referencia	20,78	$(p < 0.05)$	0,019	$(p < 0.05)$
<i>Leptodactylus latrans</i>	Cultivos	25,39	$t = 112,17; df = 450$	0,032	$t = 1,41; df = 450$
	Referencia	29,72	$(p < 0.05)$	0,031	$(p = 0.08)$
<i>Rhinella fernandezae</i>	Cultivos	16,26	$t = 45,12; df = 400$	0,23	$t = 5,35; df = 400$ (p
	Referencia	18,98	$(p < 0.05)$	0,19	$< 0.05)$

A: longitud del cuerpo al tiempo de la maduración. K: tasa de crecimiento al tiempo de la maduración. t (p): test de diferencia de medias para los parámetros A y K y su nivel de significancia.

Las anomalías registradas en larvas de estadio 40 se encontraron en ojos, eje axial y miembros (Fig. 8). Los resultados muestran una dependencia de la prevalencia de anomalías a las charcas con cultivos en larvas de *H. pulchellus* ($X^2 = 5,32; df =$

1; $N = 1200$; $p = 0,02$), *R. fernandezae* ($X^2 = 5,70$; $df = 1$; $N = 600$, $p = 0,03$) y *L. latrans* ($X^2 = 15,13$; $df = 1$; $N = 8500$; $p < 0,01$). Las prevalencias totales registradas en larvas tuvieron un orden de importancia de aparición de $> H. pulchellus > L. latrans > R. fernandezae$ (Tabla 13).

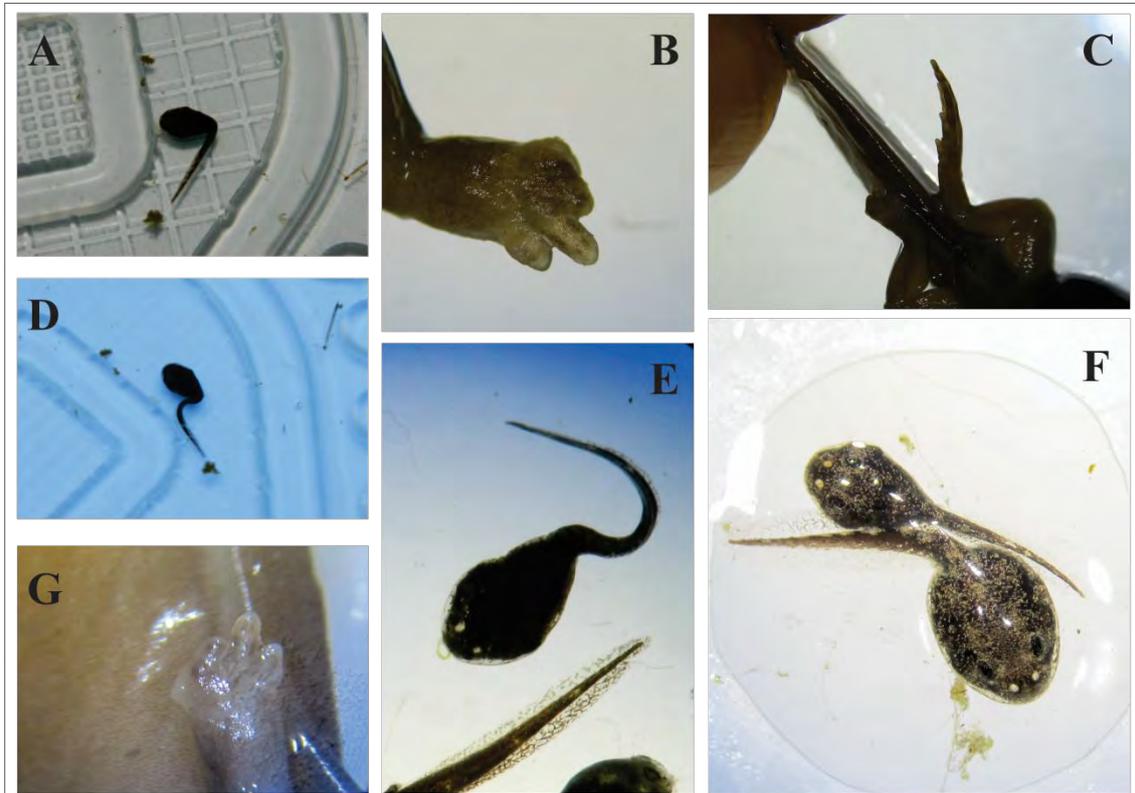


Figura 8: Anormalidades en larvas. **A, D y E:** torsión del eje axial y escoliosis en *Rhinella fernandezae*. **B y C:** ausencia de dedos y falanges en *Hypsiboas pulchellus*. **E y G:** ausencia de dedos y falanges en *Leptodactylus latrans*. **F:** tamaño de dos larvas del mismo estadio de *R. fernandezae* pertenecientes a una charca de cultivo (más pequeña) y a una charca control.

Tabla 13: Prevalencias de cada tipo de anomalía registradas en las especies estudiadas pertenecientes a las charcas de cultivos de referencia.

	Ojos		Eje Axial		Miembros		Total	
	Cul	Ref	Cul	Ref	Cul	Ref	Cul	Ref
<i>H. pulchellus</i>	0,02	-	0,32	0,17	0,35	0,09	0,36*	0,16*
<i>R. fernandezae</i>	0,05	-	0,12	0,14	0,31	0,11	0,16*	0,08*
<i>L. latrans</i>	0,10	0,01	0,43	0,05	0,27	0,01	0,24*	0,05*

Cul: cultivos. **Ref:** referencia. * Diferencias significativas en la prevalencia de cada una de las especies. – no detectadas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

EFECTO DE LAS APLICACIONES DE PLAGUICIDAS

Los ensayos con limnocorales permitieron demostrar el efecto que producen las aplicaciones de plaguicidas sobre la supervivencia y las alteraciones en el movimiento de larvas de *H. pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans*; tres especies representativas de la Región Pampeana. Los resultados obtenidos sobre estos puntos finales indican que los máximos efectos fueron observados a las 48 h de ocurridos los eventos de exposición. Si bien no todas las diferencias entre las 24 y 48 h fueron significativas, pudo demostrarse que los efectos se prolongan por los menos a las 48 h de exposición y que en el caso de las alteraciones del movimiento no hubo recuperación, sino un aumento de los mismos.

Las aplicaciones de endosulfán indujeron mayores efectos letales que el resto de los plaguicidas, en concordancia con los resultados obtenidos en estudios de laboratorio [46, 53, 54, 56, 70] sobre la toxicidad relativa de los compuestos estudiados. Las concentraciones que produjeron prácticamente el 100% de la mortalidad de larvas se encuentran en un rango de 230,3 $\mu\text{g/L}$ y 327,5 $\mu\text{g/L}$ los cuales exceden ampliamente a las CL_{50} informadas en la literatura para varias especies en ensayos de laboratorio [46, 53, 57, 70] y concuerda con el hecho de que a las 24 h de ocurridas las aplicaciones prácticamente no quedaron sobrevivientes. Por esto los efectos sobre el movimiento no pudieron ser estudiados.

Ninguna de las aplicaciones de glifosato evaluadas provocó efectos letales, no obstante se observaron severos efectos sobre la natación relacionados a concentraciones que van desde los 54,3 $\mu\text{g/L}$ a los 179,3 $\mu\text{g/L}$. El glifosato es un herbicida considerado como probablemente no peligroso por WHO y levemente tóxico por USEPA [44]. Numerosos autores han concluido que bajo condiciones normales de uso, este herbicida

no representa un peligro en el medio acuático, ya que tanto el glifosato como los componentes de las formulaciones se diluyen lo suficiente en cuerpos de agua lóticos [130, 131]. Sin embargo, en los cuerpos de agua lénticos y poco profundos, como son las charcas temporarias, las tasas de aplicación normales de formulados (activos y aditivos) pueden alcanzar niveles de concentración a los que se les asocian efectos tóxicos [132], además de que la persistencia de la toxicidad puede extenderse por días o semanas [133]. Trabajos realizados en anfibios alertan sobre la toxicidad del glifosato y demuestran que formulaciones comerciales del herbicida, en particular aquellas que contienen POEA, pueden resultar perjudiciales [69, 70, 134]. En concordancia con los estudios anteriormente expuestos, los resultados del presente trabajo de tesis muestran la inducción de efectos subletales adversos del herbicida formulado en poblaciones nativas de anfibios.

Respecto a las aplicaciones de la mezcla cipermetrina-glifosato, las mismas determinaron efectos en correspondencia con la presencia detectada de plaguicidas en agua. Es probable que la toxicidad elevada de esta mezcla esté siendo predominantemente aportada por exposición a la cipermetrina, dado que cuando se evaluó el glifosato por separado no se observaron efectos sobre la mortalidad y estos resultados se encuentran en correspondencia con estudios realizados con mezclas en otros organismos [100], aunque es apropiado tener en cuenta que la toxicidad del glifosato puede verse aumentada en presencia de mezclas [135]. La única oportunidad en la cual esta mezcla no generó efectos letales ni subletales fue en la aplicación número cinco (AP5), correspondiente al establecimiento Remes. Los análisis químicos de muestras ambientales determinaron una concentración de cipermetrina en agua de 3,9 $\mu\text{g} / \text{L}$, mientras que no fue detectado glifosato, indicando que los plaguicidas no alcanzaron las charcas en contraposición con otras aplicaciones evaluadas en las que sí

se obtuvieron efectos y las concentraciones detectadas fueron superiores. Este escenario podría estar asociado a la mitigación ofrecida por la cobertura vegetal muy conspicua en las márgenes que rodeaban las charcas al momento de la aplicación.

Existe un consenso general en la bibliografía de que aquellas concentraciones de compuestos tóxicos que inducen efectos adversos en condiciones experimentales de laboratorio son elevadas y no siempre ocurren en condiciones naturales [27]. En contraposición, ha sido demostrado que la interacción de los plaguicidas con factores ambientales puede determinar efectos aditivos o sinérgicos [107, 108, 136] o alterar las condiciones de los ecosistemas (florecimientos algales, cambios en el pH y OD, cambios en las relaciones intra-interespecíficas) generando efectos de manera indirecta [114, 137 - 140]. Las determinaciones de plaguicidas en agua indican que las concentraciones inductoras de efecto abarcan un intervalo amplio y que la comparación con los datos obtenidos en ensayos de laboratorio para el mismo efecto no resulta consistente. Por ejemplo, las concentraciones de glifosato que causaron efectos subletales en los experimentos a campo son inferiores a las obtenidas en laboratorio utilizando formulaciones comerciales [19], mientras que las concentraciones de cipermetrina que produjeron efectos sobre la supervivencia de larvas son similares a las que producen efectos en ensayos de toxicidad con condiciones controladas de laboratorio para especies nativas [64, 65].

En todas las muestras de sedimento tomadas 24 h de ocurridas las aplicaciones se detectaron los insecticidas aplicados. Las concentraciones de clorpirifós abarcaron un rango de 12,4 a 17,2 $\mu\text{g /kg}$, las de endosulfán de 39,5 a 87,3 $\mu\text{g /kg}$ y las de cipermetrina 20,6 - 73,2 $\mu\text{g /kg}$. Estas concentraciones resultan altas en comparación a las obtenidas por otros autores que han conducido estudios en la Región Pampeana [77, 99, 100, 141, 142]. Estas diferencias pueden deberse a que la toma de muestras fue

cercana en el tiempo a la aplicación y también al tipo de ambiente en que se realizó el presente trabajo (cuerpos de agua temporarios, someros y de dimensiones pequeñas). Asimismo, en reiteradas ocasiones se detectó la presencia de endosulfán y clorpirifós sin haber ocurrido aplicaciones previas. Las concentraciones fueron de un orden de magnitud inferior a aquellas encontradas cuando ocurrió una aplicación 24 h antes de tomadas las muestras, no superando los 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estos resultados se encuentran en concordancia con la persistencia de estos plaguicidas en el ambiente sobre todo en sedimentos [143, 144]. En una única oportunidad fue registrada cipermetrina sin conocimiento de aplicaciones previas la cual presentó concentraciones por debajo de los 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Fue demostrado que algunos factores ambientales pueden modificar la toxicidad de los plaguicidas a través de estudios desarrollados valorando las interacciones entre pH, OD, temperatura, partículas disueltas y los plaguicidas [107, 136, 145 - 147]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indicaron que los parámetros fisicoquímicos medidos en las charcas no cambiaron respecto de las aplicaciones. Independientemente de ello se registraron diferencias en la concentración de OD entre los cuerpos de agua evaluados. Los valores de OD en charcas de sitios de referencia (SA1 y SA2) fueron superiores a los valores de las charcas con cultivos, esta diferencia puede deberse al efecto de las elevadas cantidades de nutrientes habitualmente asociadas a cuerpos de aguas adyacentes a cultivos [148]. Es apropiado tener en cuenta que la entrada por escorrentía superficial de materia orgánica en charcas rodeadas de cultivos fertilizados puede producir eutrofización, aumento del fitoplancton y de producción de clorofila [149]. Estos ambientes tendrán un amplio rango de variación de OD, siendo el momento de la floración algal el máximo valor y cuando ésta termina los procesos de descomposición se encargarán de consumir el OD [150]. Si bien han sido demostrados

efectos adversos de la eutrofización sobre la anfibiofauna [151, 152], los valores de OD obtenidos en este estudio tanto para charcas con cultivos como para aquellas consideradas de referencia, se encuentran entre los aceptados como requerimiento fisiológico para larvas de anfibios [153]. Por esta razón el OD (independientemente de las aplicaciones de plaguicidas) no sería un factor determinante de la reducción en la supervivencia de larvas registradas en charcas con cultivos aunque un estudio detallado de los valores de OD luego de ocurridas las floraciones algales podría arrojar evidencia concluyente sobre el efecto del OD en la supervivencia larval.

Fueron registrados superiores índices de riqueza de macrófitas en las charcas de referencia (SA1 y SA2). En el transcurso del estudio fue presenciado el uso de herbicidas como glifosato y 2,4-D los cuales una vez aplicados, en ocasiones intencionalmente, reducen la vegetación de áreas inundables que constituyen las charcas temporarias en las que los anfibios se reproducen durante la época de lluvias. Estas charcas tienen además los bordes sembrados. Este tipo de manejo podría determinar la baja riqueza de macrófitas en las charcas de los cultivos y, aunque no fue estudiada la cobertura vegetal, ésta resulta a simple vista sensiblemente menor en chacras de agroecosistemas cultivados (ver Fig. 3). A su vez, algunos autores han demostrado que en presencia de plantas macrófitas, el efecto y la persistencia de la cipermetrina sobre larvas de anfibios y copépodos se ve mitigado o reducido [102, 154], pudiendo explicar el mayor efecto de las aplicaciones que muestran las charcas de los establecimientos Los Talas y La Abundancia, las cuales se encuentran prácticamente desprovistas de vegetación macrófita.

Es interesante destacar que si bien no fueron observadas mortalidades larvales relacionadas a las dos aplicaciones de glifosato, se evidenció una disminución de la abundancia, medida 5 días después de la aplicación. Una posible explicación radica en

que la pérdida de movimiento (observada en larvas de los limnocorales durante las aplicaciones) podría conducir secundariamente a la muerte. Ha sido demostrado que una pérdida de la natación reduce el tiempo dedicado a la búsqueda de alimento y que los individuos afectados son predados con mayor facilidad [74, 155, 156]. Alternativamente puede esperarse que la persistencia de la toxicidad de los componentes que conforman los formulados de glifosato [133] determine efectos que pueden ser observados tardíamente. Recientes trabajos han dado a conocer el efecto retrasado que pueden producir algunos plaguicidas como el endosulfán [54] asociados en este caso a la alta persistencia del compuesto.

Aunque es difícil separar los efectos producidos por los plaguicidas de otros factores de estrés, la técnica de limnocorales permitió explorar los mecanismos de impacto de los plaguicidas en condiciones reales de exposición. Esta técnica cuenta con una serie de ventajas que los convierten en útiles herramientas de evaluación ecotoxicológica [74]. La única desventaja hallada fue que luego de una semana, las larvas comenzaron a mostrar leves indicadores de efecto de los mecanismos de encierro. Tanto en charcas de cultivos como en charcas control se registraron movimientos lentos de escape y si bien no ocurrieron mortalidades larvales, resultó adecuado seguir estudiando aspectos del ciclo larval en individuos de vida libre.

EVENTOS REPRODUCTIVOS

Algunas especies de anfibios tienen mecanismos que permiten evitar sitios contaminados durante la reproducción [157]. Nuestros resultados indican una menor cantidad de puestas en las charcas de los cultivos expuestas a plaguicidas, y aunque no conocemos la concentración de los mismos en el momento exacto de la ovoposición, la menor cantidad de puestas puede estar asociada a una falta de sitios adecuados para esta

actividad, dada la baja riqueza y cobertura vegetal que poseen las charcas de cultivos. La abundancia y condición de salud de los adultos podría ser otro factor indudablemente relacionado a la cantidad de puestas resultantes de los eventos reproductivos. Este aspecto de la estructura poblacional será abordado en el Capítulo II. El efecto de plaguicidas sobre parámetros reproductivos de anfibios fue demostrado ampliamente [158, 159], por lo que es prudente esperar que la cantidad de huevos fecundados de una puesta esté siendo afectada por exposición a los mismos. Nuestros resultados indican que si bien el número de huevos fecundados es menor en las charcas de cultivos, esta diferencia no fue significativa.

ABUNDANCIAS LARVALES

Los análisis de abundancia reflejan distintas consideraciones que serán exploradas a continuación. Si bien una disminución en la tasa de eclosión demostrada como consecuencia a la exposición a plaguicidas [160] podría explicar una menor abundancia a lo largo de todo el ciclo larval, los resultados muestran que este efecto no ocurrió en las charcas de cultivos, por lo cual la reducción en la abundancia tiene que estar necesariamente asociada a las subsiguientes instancias que acontecen en el ciclo larval. Asimismo el bajo número de individuos que alcanzó la metamorfosis en las charcas con cultivos estaría relacionado por lo menos en parte, con la disminución en la abundancia de larvas que fue observada luego de las aplicaciones. Finalmente, el estudio sobre la abundancia fue consistente con los resultados sobre la supervivencia obtenidos a partir de los ensayos con limnocorales, aumentando la relevancia de estos últimos como herramienta de análisis en campo.

CRECIMIENTO Y DESARROLLO

Los resultados de las curvas de crecimiento indicaron que las larvas de los cultivos adquieren menor tamaño en las tres especies estudiadas y mayores tasas de crecimiento en *H. pulchellus* y *R. fernandezae*. En base a evidencia provista mayormente por ensayos de laboratorio, existe un consenso general acerca de la inhibición del crecimiento que producen diversos plaguicidas sobre larvas de anfibios [50, 56, 64, 160]. En ello se basa la concepción de que la inhibición del crecimiento es uno de los indicadores más sensibles de toxicidad de plaguicidas. Pero además, es propio tener en cuenta que la dieta de las especies estudiadas está basada en la comunidad algal [161]. Por un lado ha sido comprobado que pulsos de toxicidad de insecticidas eliminan parte de la comunidad asociada a los consumidores primarios (zooplancton) por lo que la comunidad algal se ve beneficiada [138]. La comunidad algal puede verse también favorecida con la entrada de materia orgánica y fertilizantes a los cuerpos de agua asociadas a los cultivos [149] o bien verse perjudicada bajo efectos directos de diversos insecticidas [105]. Han sido estudiados los efectos del glifosato sobre esta comunidad y los resultados indican un aumento de la productividad primaria tanto en fitoplancton como en perifiton, y un cambio en la composición específica en favor de un mayor desarrollo de cianofíceas [162, 163], las cuales son un ítem alimenticio preponderante en muchas especies de anfibios [164, 165]. Sin embargo Relyea [139] ha demostrado que la comunidad algal no cambia bajo efectos del glifosato y otros herbicidas. En resumen, la comunidad algal tiene un amplio intervalo de sensibilidad a los plaguicidas que pueden alterar la riqueza, la biodiversidad y la productividad primaria. No se realizaron como parte de este trabajo de tesis, estudios sobre la respuesta de las comunidades algales en relación a las aplicaciones de plaguicidas evaluados, pero una hipótesis *ad hoc* sobre la falta de alimento causante de la reducción en el crecimiento no debería ser desechada.

El tiempo en que las larvas tardan en alcanzar la metamorfosis, su relación con el efecto de los plaguicidas y el mecanismo de acción que produce esta relación, son aspectos controversiales y poco estudiados [19]. Como regla general la metamorfosis está regulada por la hormona tiroidea [166]. Los plaguicidas pueden causar (dependiendo del tipo o grupo) inhibición o incremento de la actividad tiroidea determinando el alargamiento o reducción del tiempo a la metamorfosis [167, 168]. Además, la actividad tiroidea puede estar inducida por estrés [169], con lo cual podría esperarse que independientemente del tipo de plaguicida, en las condiciones de exposición en las que se desarrollaron los estudios, las larvas completen su ciclo en menos tiempo. Esta suposición se basa en el conocido mecanismo de plasticidad fenotípica característico de larvas de anfibios, por el cual pueden acelerar su desarrollo y alcanzar en menor tiempo a la metamorfosis cuando se encuentran en ambientes desfavorables [104, 170]. Si esto ocurre, las larvas llegan a la metamorfosis, en general, con tamaños y pesos por debajo de los estándares de salud, que a su vez podrían disminuir el rendimiento terrestre [171]. Los resultados obtenidos en este trabajo son concordantes con la última hipótesis mencionada, mostrando que las larvas que alcanzan la metamorfosis en menor tiempo lo hacen con tamaños menores. Estos cortos ciclos larvales se produjeron en las charcas con cultivos que recibieron contaminación por plaguicidas.

El tamaño y el tiempo a la metamorfosis también se encuentran en estrecha relación con la temperatura, el pH y la calidad del alimento [161, 172 - 174]. Teniendo en cuenta que los valores de temperatura y pH son similares en charcas con cultivo y controles, no serían estos los factores que determinan las diferencias halladas. Como ya ha sido mencionado, un estudio apropiado de la comunidad algal y las exposiciones a

agroquímicos podría aportar evidencia sobre la disponibilidad del alimento y su interacción con los plaguicidas.

ANORMALIDADES LARVALES

Las anormalidades en el desarrollo ocurren de manera natural en todos los seres vivos. En larvas de anfibios el nivel basal de ocurrencia natural se encuentra por debajo del 5 % de la población [175]. Una plétora de estudios conducidos en laboratorio han demostrado que los plaguicidas pueden ocasionar alteraciones en el desarrollo y causar malformaciones en larvas de anfibios [64, 176 - 178]. Adicionalmente, como fue oportunamente realizado en el caso de la abundancia, tamaño y tiempo a la metamorfosis; es preciso analizar la etiología de este efecto en un contexto de múltiples factores. Numerosos causantes de anormalidades han sido propuestos en adición al efecto de agroquímicos, entre ellos se encuentran enfermedades parasitarias y radiación UV [176]. Los resultados indican que las prevalencias de anormalidades encontradas en ojos, eje axial y miembros de larvas son mayores en charcas con cultivos. Sin embargo, las prevalencias en larvas de sitios sin cultivos exceden los niveles basales propuestos. En este contexto resulta adecuado considerar la existencia de distintos factores, además de los plaguicidas, que actúan promoviendo el desarrollo de anormalidades. En el Capítulo II se desarrollará una discusión más amplia sobre este tópico.

Si bien resulta necesario realizar estudios en un contexto de múltiples factores causantes de los efectos en larvas aquí evidenciados, la reducción de la supervivencia y el movimiento, así como también el descenso de la abundancia larval, pueden correlacionarse de manera directa con la aplicación y detección de plaguicidas en las charcas evaluadas. Adicionalmente el efecto determinado sobre el tiempo y tamaño a la

metamorfosis y sobre el desarrollo de anomalías podrían generar impactos negativos en la viabilidad a largo plazo de las poblaciones de *H. pulchellus*, *L. latrans* y *R. fernandezae*. Es apropiado tener en cuenta que estos efectos en combinación con otros agentes de estrés, como la reducción y fragmentación del hábitat (que ocurren en los agroecosistemas del noreste de la provincia de Buenos Aires) podrían estar aumentando el efecto directo de los plaguicidas y causando extinciones locales.

El presente estudio aporta evidencia sobre el impacto del uso de plaguicidas sobre la fauna nativa de anfibios que habitan agroecosistemas de la Región Pampeana argentina y representa una de las primeras investigaciones realizadas en el país bajo condiciones de campo. Además de las exposiciones puntuales que se dan por aplicación directa, las larvas de anfibios están sometidas a una exposición de tipo crónica determinada por la corta duración de los períodos larvales (máximo 70 días) y la presencia de insecticidas en los sedimentos sin aplicaciones previas registradas. En este contexto se destaca la relevancia del monitoreo de efectos subletales en campo, en particular sobre poblaciones nativas habitantes de agroecosistemas de la Región Pampeana.

CAPÍTULO II

POBLACIONES DE ANFIBIOS EN AGROECOSISTEMAS. ADULTOS Y JUVENILES

INTRODUCCIÓN

La retracción distribucional y la declinación de especies de anfibios en todo el mundo resulta un hecho bien conocido y generalmente interpretado como resultado de los impactos de acciones antrópicas en ambientes acuáticos y los efectos biológicos adversos asociados [85]. Las modificaciones ligadas a la agricultura fueron tradicionalmente sugeridas como causas y numerosos trabajos de recopilación proponen que la contaminación por agroquímicos es uno de los principales factores que ocasionan la mencionada declinación [19, 38].

Si bien en los últimos años se ha incrementado el número de estudios focalizados en el efecto de plaguicidas sobre anfibios [106], la estimación de parámetros poblacionales ha merecido menor atención en la ecotoxicología de esta clase de vertebrados [179] y son escasas las evidencias referentes a la relación existente entre la contaminación por agroquímicos y el efecto adverso sobre poblaciones que habitan ambientes agrícolas [112]. La exigua información disponible se relaciona con la complejidad metodológica que dificulta probar hipótesis relativas al efecto de plaguicidas sobre los atributos o parámetros poblacionales. La mayoría de los estudios se focalizaron preferentemente en estadios larvales dado que las rutas de exposición en el medio acuático permiten una simple, robusta y rápida evaluación de los efectos, particularmente teniendo en cuenta que las larvas tienen piel permeable y que no puedan movilizarse entre cuerpos de agua [27]. En contraposición, pocos estudios han sido conducidos con individuos adultos o juveniles en condiciones de campo, dado que en este caso es difícil establecer con certeza si el animal ha estado expuesto y cuál fue la ruta de exposición, haciendo difusa la determinación causal efecto-exposición [75, 84]. En individuos adultos se desarrollaron investigaciones sobre residuos de plaguicidas en tejidos [33], inhibición de actividad enzimática [78], evitación de sitios

contaminados para la reproducción y reducción de la supervivencia [139, 157]. Resulta aún más escasa la información sobre los efectos transgeneracionales que pueda ocasionar la exposición larval en rasgos de los adultos o cómo esto puede afectar a la estructura poblacional [80, 81].

Las medidas del cuerpo de un individuo son importantes características demográficas [180]. El tamaño y peso pueden influenciar otras características tales como tasas metabólicas, tasas de crecimiento y locomoción y determinar atributos poblacionales como la abundancia o la densidad [181]. La relación existente entre el tamaño y peso de los individuos en una población se expresa como un índice de condición corporal que puede proveer un muy sensible indicador de estrés ambiental para muchas especies y contextos [182].

El término anormalidad refiere a cualquier desviación del intervalo normal de variación morfológica [176] que ocurre en la mayoría de los animales, como una pérdida de simetría o un desbalance en estructuras, colores u otros atributos morfológicos [183]. En los anfibios, un pequeño número de anormalidades inducidas por mutaciones, errores del desarrollo o daños por predación ocurren naturalmente por debajo del nivel basal de 5 % de la población [175]. Numerosos factores fueron propuestos como causantes de altas prevalencias de anormalidades en poblaciones naturales, los cuales están vinculados con infecciones parasitarias, exposición a radiación UV-b, deficiencias nutricionales, daños por predación, temperaturas extremas y contaminación química, incluidos los plaguicidas empleados en prácticas agrícolas [176]. Distintos autores dieron a conocer la existencia de altas prevalencias de anormalidades que afectan a poblaciones de anfibios de Estados Unidos de Norteamérica y Europa [14, 184 - 186], las cuales fueron extensamente estudiadas. En Sudamérica es un tema escasamente abordado y los pocos estudios existentes en

Argentina corresponden a registros aislados [187 - 188], o descripciones de anomalías en distintas especies [189]. Pocos estudios han cuantificado el tipo y frecuencia de anomalías a nivel poblacional referidas al uso del suelo en que las poblaciones se desarrollan [78] y no han sido publicados estudios de anomalías en distintos estadios de vida a nivel de poblaciones habitantes de agroecosistemas.

En capítulos precedentes se realizó un estudio sobre la exposición a plaguicidas en condiciones reales a campo, llevado a cabo desde el enfoque de la ecotoxicología orgánica, que tiene como objetivo estudiar los contaminantes de la biosfera y su efecto sobre los organismos a nivel individual [91]. Los resultados advierten disminución de la supervivencia y efectos en el movimiento producidos por las aplicaciones de plaguicidas. Además, se ha detectado que en charcas de agroecosistemas que recibieron pulsos de contaminación, las abundancias larvales se ven disminuidas y aquellos pocos individuos que alcanzaron la metamorfosis lo hicieron con tamaños pequeños producto de una inhibición del crecimiento ocurrida durante el transcurso del ciclo larval. Continuando con el marco conceptual que precede a esta tesis doctoral, se propone como objetivo del presente capítulo estimar densidades poblacionales en adultos de *Hypsiboas pulchellus*, *Rhinella fernandezae* y *Leptodactylus latrans*, incluyendo un seguimiento de anomalías e índices de condición corporal en juveniles y adultos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

Para el seguimiento de las poblaciones se seleccionaron dos agroecosistemas en cuyos cuerpos de agua también se evaluó el efecto de aplicaciones y se realizó el estudio de los ciclos larvales (Capítulo I). El primer agroecosistema corresponde al establecimiento

Los Talas (LT) y el segundo corresponde al establecimiento Santa Ana (SA) considerado como sitio de referencia, distantes 40 Km entre sí, asegurando con ello que las poblaciones estudiadas sean independientes. El estudio de los individuos juveniles se llevó a cabo en los mismos agroecosistemas que fueron contemplados en el Capítulo I e incluye a los siguientes sitios cultivados: establecimiento Los Talas (LT), establecimiento Remes (RM), establecimiento La Abundancia (LA) y por último el mencionado sitio de referencia Santa Ana (SA). Una mejor descripción de los mismos y su ubicación fueron dadas en el Capítulo I y se verán ampliadas en el Capítulo III.

RELEVAMIENTO DE ANFIBIOS

Las especies seleccionadas son las mismas que fueron utilizadas para la evaluación de los efectos de plaguicidas sobre larvas, que si bien pueden ocupar distintos microhábitats o profundidades dentro de la columna de agua, tienen durante el estadio larval, hábitos completamente acuáticos y se alimentan de microorganismos algales [190, 191]. Por el contrario, los adultos tienen distintos hábitos y los nichos tróficos son marcadamente diferentes; ambas características representan distintos escenarios de exposición. *Rhinella fernandezae* es un sapo de la familia Bufonidae, tiene hábitos terrestres y se alimenta fundamentalmente de formícidos [192]. *Leptodactylus latrans* es una rana perteneciente a la familia Leptodactylidae, tiene hábitos semi-acuáticos y se alimenta mayormente de coleópteros y arácnidos e *Hypsiboas pulchellus* pertenece a la familia de ranas Hylidae, tiene hábitos trepadores y se alimenta en general de dípteros y colémbolos [193].

Los monitoreos de adultos fueron llevados a cabo durante una temporada reproductiva, desde septiembre de 2009 hasta abril de 2010. En cada cuerpo de agua se realizaron 3 transectas independientes (50 x 2 m) y los individuos fueron colectados por

encuentros visuales [122]. Cada ejemplar fue colocado en una bolsa plástica descartable, y devuelto al mismo sitio donde fue colectado luego de efectuarse el marcado y las mediciones (peso y tamaño). Las marcas individuales fueron realizadas con técnicas de remoción de falanges (*toe-clipping*) siguiendo la combinación de código único propuesta por Donnelly [194].

La técnica de marcado empleada es mencionada como una técnica invasiva que puede perjudicar a los individuos en los cuales es aplicada [195]. Por ello, antes de iniciados los muestreos se realizaron pruebas extrayendo falanges de ejemplares correspondientes a las especies estudiadas para evaluar el efecto de este tratamiento. Luego de efectuadas las remociones en distintas combinaciones, los individuos fueron mantenidos en laboratorio y se realizó un seguimiento de los mismos durante los días posteriores. No se registraron mortalidades, ni tampoco infecciones en los miembros. Lo propio fue realizado en condiciones de campo, pero esta vez se efectuó la captura de individuos vocalizando, luego de la remoción de falanges fueron devueltos al sitio de vocalización e inmediatamente todos los individuos siguieron con su actividad. El estudio de los parámetros poblacionales fue realizado sólo sobre individuos adultos puesto que la técnica de marcado utilizada no resultó apropiada para juveniles, dado el escaso tamaño de los mismos y la imposibilidad de manipulación.

Para realizar el estudio en los estadios juveniles pertenecientes a las tres especies mencionadas, se llevaron a cabo muestreos cuando culminaron los ciclos larvales estudiados en el capítulo anterior (Tabla 14). Se colectaron 50 individuos por charca correspondientes a cada ciclo. Cabe destacar que cada ciclo ocurrido bajo exposición fue comparado con aquellos que sucedieron en las charcas control. Los ciclos que ocurrieron con exposición a endosulfán o clorpirifós no alcanzaron a completarse y fueron extraídos de este análisis.

Tabla 14: Ciclos larvales y plaguicidas a los cuales estuvieron expuestos las poblaciones estudiadas en el Capítulo I. Cuando llegaron a su culminación se estudiaron los individuos juveniles.

Sitio	Evento de exposición	Charca	Número de ciclo	Especie
LT	CY-GLY	4	1	<i>Hypsiboas pulchellus</i>
			2	<i>Leptodactylus latrans</i>
LT	GLY	4	3	<i>Hypsiboas pulchellus</i>
LT	GLY	2	4	<i>Hypsiboas pulchellus</i>
RM	CY-GLY	2	5	<i>Rhinella fernandezae</i>
RM	CY-GLY	2	6	<i>Hypsiboas pulchellus</i>
LA	CY-GLY	2	7	<i>Rhinella fernandezae</i>

LT: establecimiento Los Talas. **RM:** establecimiento Remes. **LA:** establecimiento La Abundancia. **CY:** cipermetrina. **GLY:** glifosato.

El peso de todos los individuos (juveniles y adultos) fue tomado con una balanza digital Ohaus ScoutPro 400 (0,01 g de precisión) y el tamaño del cada individuo, expresado como la longitud hocico-cloaca (LHC), fue medido con un calibre digital Svhwys (0,01 mm de precisión). Las anomalías fueron diagnosticadas siguiendo la clasificación propuesta por Meteyer [196]. En el caso de los individuos juveniles fueron evaluadas con una lupa Leica ES2.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La abundancia fue estudiada en poblaciones de tipo cerrado. Para evaluar el cierre de las poblaciones se utilizaron las pruebas de Otis y Burham & Stanley [197] del programa CloseTest. Posteriormente, las abundancias se calcularon mediante el programa MARK [198, 199] y se extrapolaron a la superficie de cada sitio evaluado (LT y SA) para obtener los valores de densidad. Además, fueron evaluados los potenciales efectos sobre la heterogeneidad individual, la respuesta conductual a la captura y el tiempo relacionado con las variaciones en las probabilidades de captura con el Programa Mark [197, 200]. Para este fin, se llevaron a cabo distintos modelos de captura-recaptura: M0

(probabilidad de captura constante), MT (probabilidad de captura afectada por el tiempo), MB (probabilidad de captura con respuesta de comportamiento), MH (probabilidad de captura con heterogeneidad entre individuos), Mtb (probabilidad de captura afectada por el tiempo y la respuesta conductual), MTH (probabilidad de captura afectada por el tiempo y con la heterogeneidad entre individuos), mbH (probabilidad de captura afectada por la respuesta conductual y con la heterogeneidad entre los individuos), y Mtbh (probabilidad de captura afectada por el tiempo, la respuesta conductual y la heterogeneidad entre los individuos). La heterogeneidad fue modelada con un modelo de mezcla finito [201] (Pledger 2000) y con dos grupos de animales: anormales y normales. El criterio de selección de Akaike (AIC) fue utilizado para reconocer el modelo más adecuado para cada conjunto de datos.

El índice de condición corporal (ICC) fue calculado para los individuos juveniles y adultos de las tres especies estudiadas. Las diferencias en el ICC de juveniles entre las charcas ubicadas en sitios cultivados (LT, RM y LA) y en el sitio de referencia (SA) fueron analizadas mediante un modelo lineal general mixto (MLGrM) con distribución de error normal [126]. La especie (*H pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans*), el número de ciclo (1-7) y el tipo de agroecosistema (cultivado y de referencia) fueron considerados como efectos fijos y cada charca como efecto aleatorio. Para el caso de ICC en adultos se implementó un MLGrM con distribución de error normal [126], considerando en este caso la especie (*H pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans*), el sexo (hembra y macho), y el tipo de agroecosistema (cultivado y de referencia) como efectos fijos. La ocasión de muestreo fue considerada como efecto aleatorio.

Las anormalidades para cada especie estudiada y en cada clase de edad fueron expresadas como prevalencias, las cuales se calcularon como la relación entre el número de individuos anormales/ el total de individuos muestreados y fueron expresadas

porcentualmente. Los análisis estadísticos fueron realizados sin tener en cuenta el tipo de anormalidad. Para explorar diferencias en las prevalencias de anormalidades registradas en juveniles de sitios cultivados y el sitio de referencia se realizó un *test de t* pareado para cada especie. Fueron considerados como pares los ciclos larvales estudiados. Para verificar las diferencias en las prevalencias de anormalidades entre poblaciones de anfibios adultos del sitio cultivado (LT) y el sitio de referencia (SA), se empleó un *test de t* pareado para cada especie. En este caso se consideró a la ocasión de muestreo como factor de repetición. Fueron corroborados los supuestos estadísticos para cada análisis.

De modo general, en los análisis en que se implementaron MLGrM se utilizó el procedimiento de selección *backward*, por medio del cual se removieron los términos no significativos de cada modelo uno por uno, en orden decreciente de nivel de interacción y en orden decreciente de *p* en el caso de tratarse del mismo nivel [127]. Fueron evaluadas las significancias de los efectos aleatorios con un test de razón de verosimilitud (*likelihood-ratio*) [126,127].

Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa R, Versión 2.15.1 (R Development Core Team 2012) y el paquete adicional *nlme* [128].

RESULTADOS

ESTUDIO POBLACIONAL

Las densidades poblacionales fueron superiores en todas las especies estudiadas pertenecientes al establecimiento Santa Ana, considerado como sitio de referencia (Tabla 15). Para el caso de *R. fernandezae* y *L. latrans* se registró un único pulso reproductivo durante octubre-noviembre y setiembre-octubre-noviembre, respectivamente. En el caso de *H. pulchellus* se registraron dos pulsos reproductivos en

ambos sitios de estudio, el primero ocurrió durante los meses de setiembre a noviembre, mientras que el segundo se registró entre febrero y abril de 2012.

Las probabilidades de captura (c) y recaptura (p) separadas por estratos (individuos normales vs anormales) sólo pudieron ser calculadas para *R. fernandezae* y los valores de las mismas son $c = 0,360 (\pm 0,05)$ y $p = 0,069 (\pm 0,02)$ para individuos normales y $c = 0,361 (\pm 0,06)$ y $p = 0,039 (\pm 0,02)$ para individuos que presentaron anomalías. No se observaron diferencias significativas en las probabilidades de captura y recaptura ($p = 0,0002$; $p = 0,01$ respectivamente) entre los individuos que presentaron o no presentaron anomalías.

Tabla 15: Densidades poblacionales en adultos de las tres especies evaluadas dos agroecosistemas.

	<i>Rf</i>	<i>Ll</i>	<i>Hp1</i>	<i>Hp2</i>
LT	101(±12) ind/ha	19 (±4) ind/ha	39 (±2) ind/ha	40 (±3) ind/ha
SA	135(±17) ind/ha	34 (±2) ind/ha	110 (±10) ind/ha	152 (±30) ind/ha

LT: establecimiento Los Talas. **SA:** establecimiento Santa Ana. **Rf:** *Rhinella fernandezae*. **Ll:** *Leptodactylus latrans*. **Hp1:** *Hypsiboas pulchellus* primer ciclo. **Hp2:** *Hypsiboas pulchellus* segundo ciclo.

ÍNDICE DE CONDICIÓN CORPORAL

Los resultados para la clase etaria de juveniles indican que existen diferencias significativas entre los individuos que cumplieron su ciclo en las charcas de los cultivos y el sitio control. Los ICC no difirieron entre especies y tampoco entre los ciclos estudiados, siendo el único factor determinante el tipo de agroecosistema en que se enclavan las chacras donde se desarrollan las larvas (Tabla 16). En la Figura 9 se representan los valores estimados y sus desvíos correspondientes al ICC de juveniles de las tres especies estudiadas para cada tipo de agroecosistema. Nótese que la variación aportada por los ciclos estudiados y el número de charca no fue significativa, por lo cual se representaron conjuntamente los ICC de los sitios cultivados.

Tabla 16: Modelo lineal general mixto para ICC de juveniles de las tres especies estudiadas en los distintos tipos de agroecosistemas.

Efectos	F-test	P
Fijos		
Intercepto	$F_{1,976} = 204,23$	$< 0,001$
Especie	$F_{2,974} = 2,12$	$= 0,12$
Número de ciclo	$F_{5,971} = 0,84$	$= 0,52$
Tipo de agroecosistema	$F_{1,976} = 25,26$	$< 0,001$
Aleatorios	Varianza-SD ()	TRV
Número de Charca	15,33 (0,027)	$\chi^2_1 = 2,4, p = 0,12$
Residual	8,34 (1.41)-	

TRV: Test de razón de verosimilitud

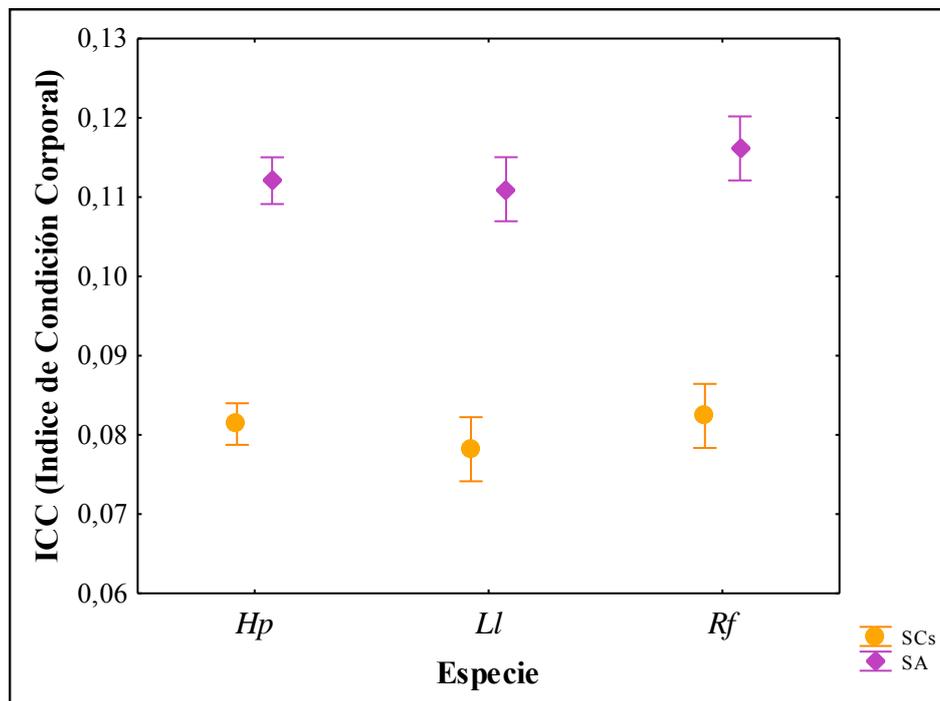


Figura 9: Índices de condición corporal para juveniles de las tres especies estudiadas. **Hp:** *Hypsiboas pulchellus*, **Ll:** *Leptodactylus latrans*, **Rf:** *Rhinella fernandezae*. **SCs:** sitios cultivados (incluyen a los establecimientos Los Talas, La Abundancia y Remes. **SA:** establecimiento Santa Ana (sitio de referencia).

Para el caso de los individuos adultos, los resultados indican que el sexo, la especie y el tipo de agroecosistema determinan el ICC (Tabla 17). La prueba de Tukey *a posteriori* mostró que los ICC correspondientes al sitio cultivado son significativamente inferiores ($p < 0,05$) en hembras de las tres especies estudiadas, mientras que en el caso de los machos sólo se encontraron diferencias significativas para *L. latrans* (Fig. 10 y 11).

Tabla 17: Modelo lineal general mixto para el ICC de adultos de las tres especies estudiadas en los distintos tipos de agroecosistemas..

Efectos	F-test	P
Fijos		
Intercepto	$F_{1,342} = 20,10$	< 0,001
Especie	$F_{2,341} = 0,83$	= 0,004
Sexo	$F_{5,337} = 0,14$	= 0,02
Tipo de agroecosistema	$F_{1,342} = 15,49$	< 0,001
Aleatorios		
Ocasión de muestreo	12,32 (0,13)	$\chi^2_{1} = 0,73, p = 0,39$
Residual	3.38 (0.61)	

TRV: Test de razón de verosimilitud

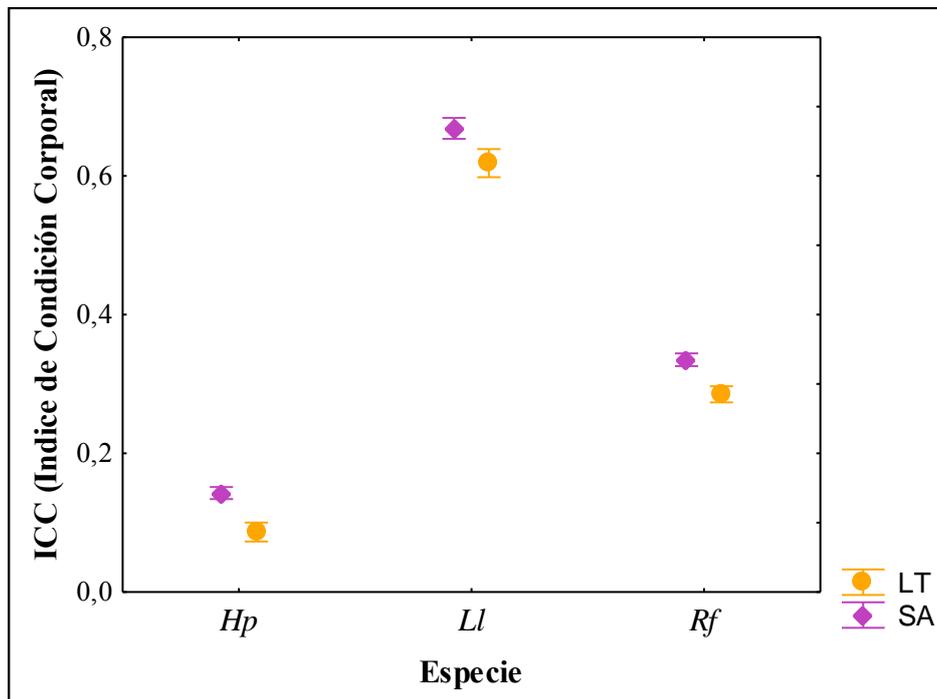


Figura 10: Índices de condición corporal para hembras adultas de las tres especies estudiadas. **Hp:** *Hypsiboas pulchellus*, **Ll:** *Leptodactylus latrans*, **Rf:** *Rhinella fernandezae*. **LT:** establecimientos Los Talas. **SA:** establecimiento Santa Ana.

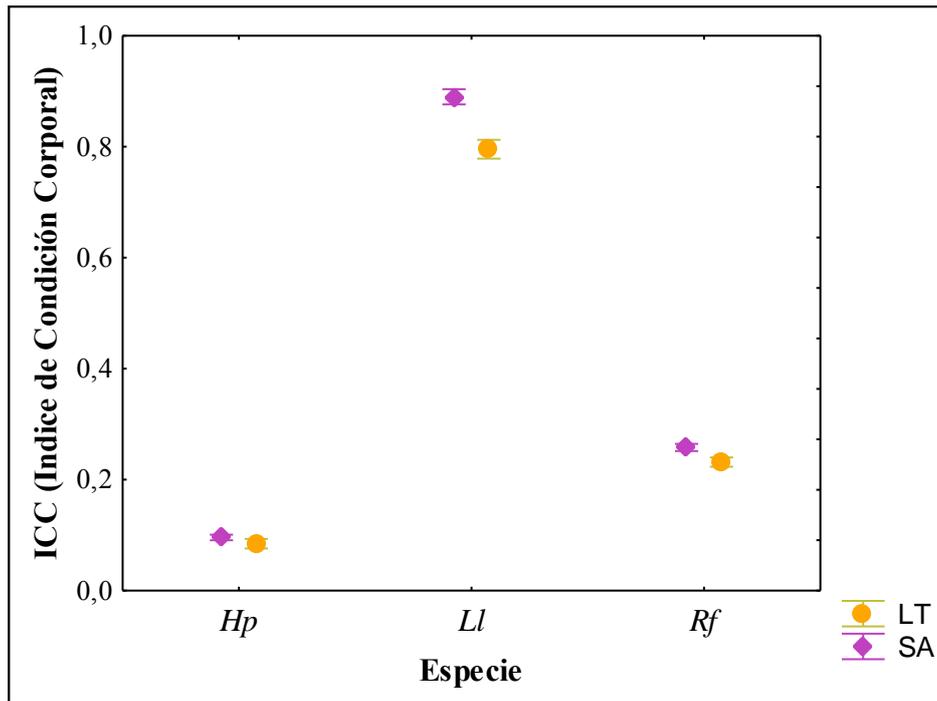


Figura 11: Índices de condición corporal para machos adultos de las tres especies estudiadas. **Hp:** *Hypsiboas pulchellus*, **Ll:** *Leptodactylus latrans*, **Rf:** *Rhinella fernandezae*. **LT:** establecimientos Los Talas. **SA:** establecimiento Santa Ana.

ANORMALIDADES

Las anomalías halladas en juveniles se muestran en la Figura 12 y fueron en orden decreciente de aparición escoliosis, ectrodactilia, ectromelia, hemimelia, braquidactilia, amelia, despigmentación y ojos malformados (descoloración y ausencia). Los resultados indican que las prevalencias de anomalías fueron significativamente mayores en las poblaciones correspondientes a los sitios cultivados (LR, RM y LA) para las especies *H. pulchellus* ($t = 1,87$; $df = 15$; $p = 0,04$), *R. fernandezae* ($t = 2,44$; $df = 8$; $p = 0,02$) y *Leptodactylus latrans* ($t = 2,71$; $df = 5$; $p = 0,02$). Los valores de las prevalencias expresadas porcentualmente se muestran en la Figura 13.

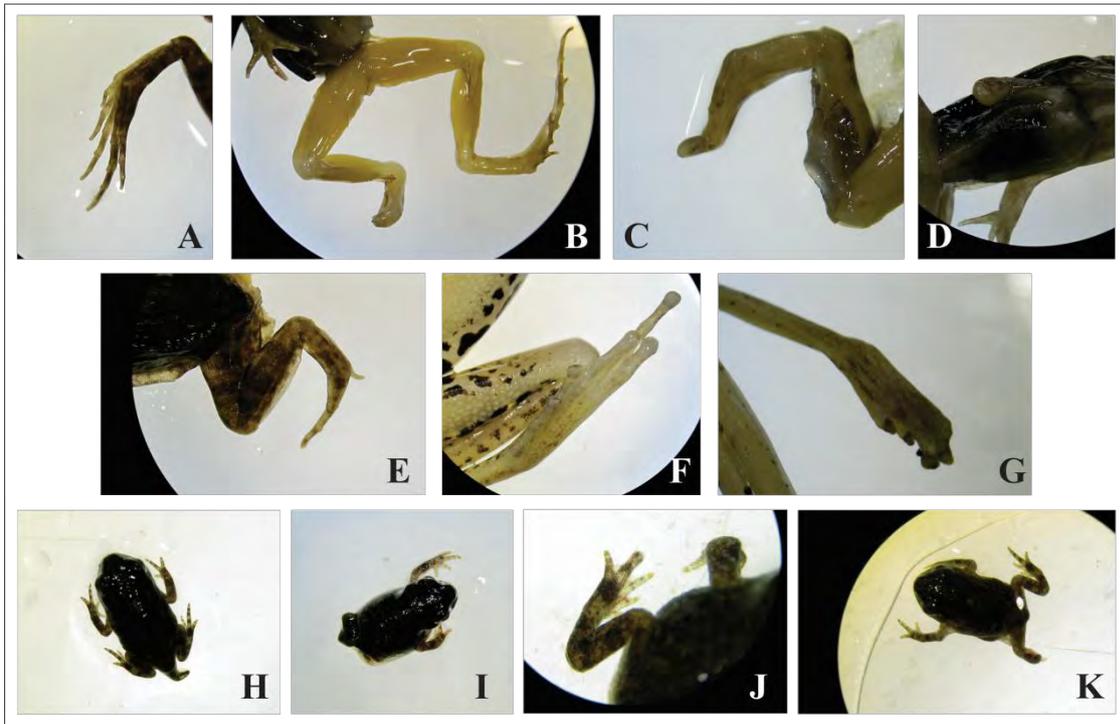


Figura 12: Anormalidades en juveniles. **A-E:** *Leptodactylus latrans*. **A:** miembro posterior normal. **B-C:** ectrodactilia. **D:** ectromelia. **E:** braquidactilia. **F-G:** *Hypsiboas pulchellus*. **F:** miembro posterior normal. **G:** braquidactilia. **H-I:** *Rhinella fernandezae*. **H:** individuo normal. **I:** amelia. **J:** braquidactilia. **K:** ectrodactilia.

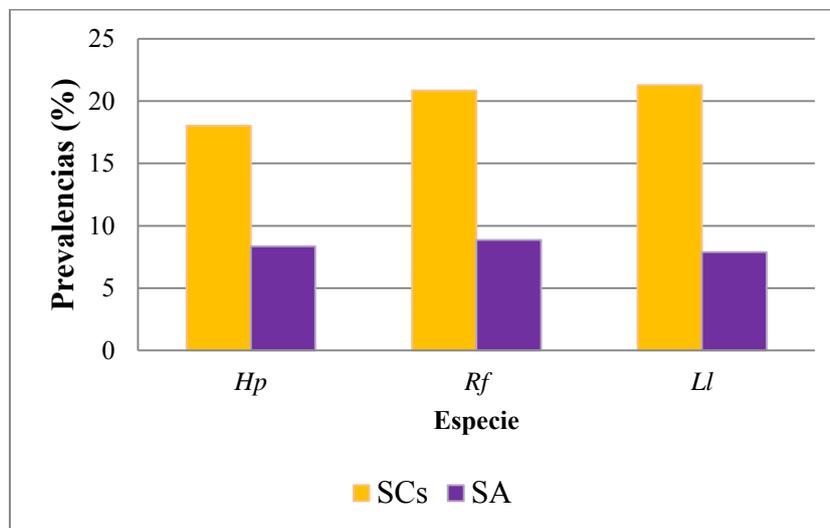


Figura 13: Prevalencias de anomalías en juveniles de las tres especies estudiadas. **Hp:** *Hypsiboas pulchellus*. **Rf:** *Rhinella fernandezae*. **Ll:** *Leptodactylus latrans*.

Las anomalías registradas en adultos fueron en orden decreciente de aparición ectrodactilia, ectromelia, braquidactilia, despigmentación, hemimelia, amelia, escoliosis, microcefalia y ojos malformados (Fig. 14). Los resultados muestran que las prevalencias de anomalías son superiores en poblaciones de *R. fernandezae* ($t =$

2,48; $df = 25$; $p = 0,01$) y *Leptodactylus latrans* ($t = 4,71$; $df = 21$; $p < 0,05$) pertenecientes al sitio cultivado LT, mientras que estas diferencias no fueron significativas en el caso de *H. pulchellus* ($t = 1,45$; $df = 29$; $p = 0,08$) (Fig. 15). En la Tabla 18 se detallan los tipos de malformaciones por especie y clase etaria, de la cual se desprende que los mismos tipos de anomalías fueron registradas en poblaciones pertenecientes al sitio cultivado y al sitio de referencia y que las prevalencias de los tipos difieren respecto de la clase etaria.

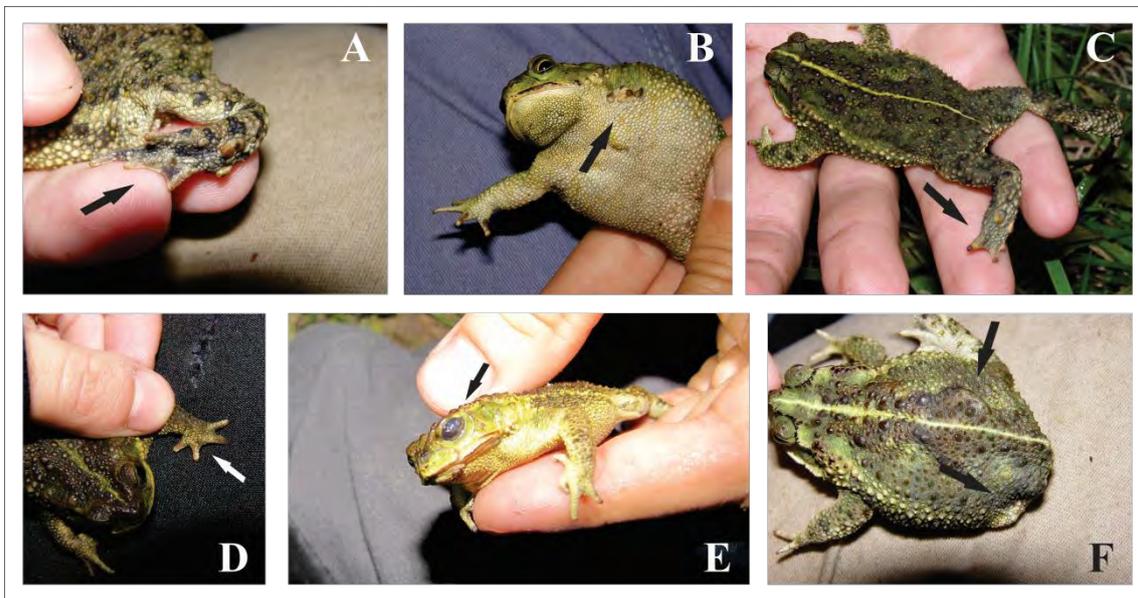


Figure 14: Anormalidades detectadas en adultos. **A:** braquidactilia + ectrodactilia **B:** hemimelia. **C:** braquidactilia + ectrodactilia. **D:** braquidactilia. **E:** ojos malformados. **F:** amelia + escoliosis. Las fechas indican la posición de la anomalía.

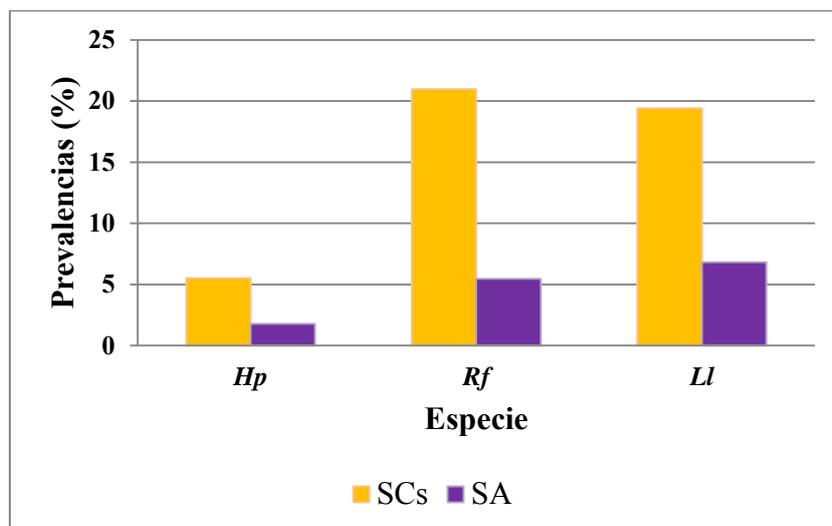


Figura 15: Prevalencias de anomalías en juveniles de las tres especies estudiadas. **Hp:** *Hypsiboas pulchellus*. **Rf:** *Rhinella fernandezae*. **Ll:** *Leptodactylus latrans*.

Tabla 18: Prevalencias de cada tipo de anomalía en las distintas edades de las tres especies estudiadas considerando ambos sitios de estudio.

	ESC	ECD	ECM	HEM	BRA	AM	DESP	OM	MICC
<i>Hypsiboas pulchellus</i>									
Juvenil	3,93	2,76	1,97	1,80	1,43	1,02	0,15	0,13	-
Adulto	2,43	-	-	-	-	-	1,02	0,18	-
<i>Rhinella fernandezae</i>									
Juvenil	3,74	3,12	2,48	1,87	1,93	1,19	0,39	0,09	-
Adulto	0,12	2,32	3,01	2,17	2,15	2,43	1,65	0,21	0,12
<i>Leptodactylus latrans</i>									
Juvenil	3,60	3,25	2,71	2,21	1,17	0,13	1,33	0,18	0,08
Adulto	0,09	2,97	2,13	1,98	2,67	1,44	1,59	0,24	-

ESC: escoliosis. **ECD:** ectrodactilia. **ECM:** ectromelia. **HEM:** hemimelia. **BRA:** braquidactilia. **AM:** Amelia. **DESP:** despigmentación. **OM:** ojos malformados. **MICC:** microcefalia. Los valores están expresados en porcentajes (%).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los efectos de plaguicidas sobre la dinámica y estructura de poblaciones de anfibios han sido poco estudiados fundamentalmente porque es difícil establecer la relación causa-efecto [112]. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las poblaciones de *R. fernandezae*, *L. latrans* e *H. pulchellus* en el sitio cultivado son menos densas. Si bien estos resultados no pueden ser atribuidos únicamente al efecto de plaguicidas, las mortalidades larvales y las bajas abundancias de individuos que alcanzaron la metamorfosis en sitios cultivados (Capítulo I) permiten inferir que los efectos producidos por plaguicidas están contribuyendo a la modificación de la estructura de las poblaciones adultas de anfibios, pudiendo alterar de este modo la viabilidad poblacional [80, 81]. Los resultados obtenidos en el Capítulo I sobre la menor cantidad de eventos reproductivos y puestas que ocurren en los sitios cultivados podrían estar relacionados a las poblaciones empobrecidas que habitan este tipo de agroecosistemas.

Relyea [111] y Brühl *et al.* [75] comprobaron que aplicaciones de plaguicidas generaron mortalidad de individuos adultos y juveniles que habitan ambientes terrestres. Aunque en el presente trabajo de tesis no ha sido estudiada la respuesta de estas clases etarias a las aplicaciones de plaguicidas, los efectos de esta vía de exposición deberían ser considerados en adición a los que sufren los estadios larvales.

Dado el extenso trabajo que supone la utilización de técnicas de marcado-recaptura, este estudio se realizó sólo en dos agroecosistemas representativos de la región. Los estudios a nivel poblacional que aquí se desarrollan aportan información a pequeña escala, pero dada la extensa distribución que presentan las especies consideradas [13], un estudio a nivel metapoblacional proveerá información adicional referente al estado de las especies, en relación al extenso ambiente alterado en que se distribuyen.

Los índices de condición corporal mostraron la misma tendencia tanto en juveniles como en adultos de las tres especies estudiadas, los individuos tienen menor relación peso/ longitud del cuerpo en los sitios cultivados. En el caso de los juveniles, los análisis no mostraron una diferencia entre los ciclos evaluados, los cuales se desarrollaron bajo distintos eventos de aplicación y por lo tanto un valor menor de estos índices no puede ser atribuido a la exposición a un tipo particular de plaguicida. Cabe destacar además que individuos juveniles que cumplieron su ciclo larval bajo las aplicaciones de glifosato y de la mezcla cipermetrina-glifosato tuvieron índices de condición corporal menores aun cuando estas aplicaciones no habían producido efectos sobre la mortalidad y la reducción en el movimiento larval. Sin embargo los resultados de las determinaciones de insecticidas expresados en el Capítulo I indican que los mismos están presentes aún sin aplicaciones previas inmediatas, por lo tanto es apropiado tener en cuenta que la exposición a bajas concentraciones de plaguicidas está

ocurriendo independientemente de los pulsos de aplicación evaluados. Estas bajas concentraciones pueden estar generando, al menos en parte, efectos subletales sobre el crecimiento larval lo cual se ve reflejado en los índices de condición corporal de los juveniles.

En virtud de los resultados derivados del estudio a nivel poblacional, podría esperarse que ante una menor densidad de individuos, disminuya la competencia y aquellos sobrevivientes se beneficien de los mayores recursos disponibles, alcanzando tasas de crecimiento más elevadas o tamaños y pesos superiores. Sin embargo, nuestros resultados indican que los valores de los índices son inferiores en el sitio cultivado, pudiendo estar relacionado a una menor disponibilidad de alimento y al deterioro de condiciones de salud dadas por las reiteradas aplicaciones de plaguicidas. Es ampliamente conocido que los insecticidas aplicados no sólo afectan a las especies blanco sino a todo la fauna constituyente del agroecosistema (fundamentalmente animales ectotermos) [93, 97, 99, 100, 139, 202]. Un efecto sobre las comunidades de artrópodos, anélidos y moluscos puede ocasionar una disminución en la oferta alimentaria de las tres especies estudiadas, así como también puede proporcionar una vía de exposición a plaguicidas adicional a la aplicación directa. A su vez, la exposición directa a plaguicidas puede repercutir sobre la salud de los anfibios y en este contexto fueron demostrados efectos de inmunosupresión ocasionada por exposiciones subletales [203, 204] y descensos en los niveles de actividad enzimática [48, 109, 205, 206], los cuales pueden propiciar el deterioro de las poblaciones a través de un aumento de la vulnerabilidad a patógenos y enfermedades en general [207].

Los mismos tipos de anormalidades fueron registrados en poblaciones de sitios cultivados y de referencia por lo que no podemos atribuir ningún tipo particular a la acción de plaguicidas, como ha sido mencionado por algunos autores [56, 64, 160, 178].

En juveniles se reconocieron ocho tipos de anormalidades, que también estuvieron representados en adultos, en los que además se registró microcefalia. Aunque no fueron realizados análisis estadísticos para comparar diferencias en las prevalencias de los distintos tipos de anormalidades entre juveniles y adultos, la observación de los datos surgiere que los tipos más representados en adultos son distintos a los que se encuentran mejor representados en juveniles. Los tipos más frecuentes en juveniles fueron la escoliosis y aquellas anormalidades que se localizan en los miembros (ectromelia, ectrodactilia y braquidactilia). Sin embargo en adultos de *R. fernandezae* y *L. latrans* la escoliosis tiene una baja prevalencia mientras que las anormalidades en miembros no fueron registradas en adultos de *H. pulchellus*. Estos resultados pueden ser interpretados teniendo en cuenta la biología e historia natural de las especies en cuestión. *R. fernandezae* y *L. latrans* son especies caminadoras [12] por lo que una asimetría y dislocación en la cadera afecta a esta actividad. Así mismo, *H. pulchellus* es una especie trepadora que depende de estos hábitos para alimentarse y refugiarse [12], por lo tanto un problema en las porciones distales de los miembros o la ausencia de los mismos, impediría llevar a cabo estos hábitos. Las anormalidades representan fallas o errores en los estadios primarios de desarrollo y el hecho de que puedan ser observadas en adultos, indica que no fueron letales durante los estadios larvales y juveniles [208]. Esta contextualización podría estar explicando los datos obtenidos en las tres especies estudiadas. Los resultados evidenciaron que las anormalidades registradas en adultos son aquellas que se preservan y no son letales en estadios juveniles, ¿pero cuáles son las verdaderas prevalencias a nivel poblacional? Un estudio focalizado en estadios larvales, juveniles y adultos (como el contemplado en esta tesis) resultó un enfoque adecuado para categorizar los distintos tipos de anormalidades, sus prevalencias y la relación con las distintas clases etarias de una población.

Fue ampliamente demostrado que la exposición a concentraciones subletales de plaguicidas en condiciones controladas de laboratorio produce anomalías en larvas de anfibios [56, 64, 160, 176, 178, 209]. A su vez fueron publicados trabajos sobre altas prevalencias de anfibios anormales asociados a ambientes agrícolas [14, 18, 185, 210], pero la relación con la exposición a plaguicidas como la causa de las mismas permanece incierta [85]. Las altas prevalencias de anomalías en juveniles del sitio cultivado pueden estar relacionadas a la exposición que ocurrió durante el ciclo larval (Capítulo I). Como fue mencionado previamente se registraron mayores prevalencias en poblaciones de cultivos que en aquellas que se desarrollan en el sitio de referencia (sin cultivos y sin acción directa de plaguicidas), pero los valores de estas últimas exceden el nivel basal de anomalías informado como un proceso natural [175]. Resulta necesario suponer que causas adicionales o factores de estrés, además de la exposición a plaguicidas, están ocasionando el fenómeno. En este sentido, fueron propuestos distintos factores causantes de anomalías en anfibios [176]. Los más difundidos y estudiados son probablemente la infección parasitaria por el trematode *Ribeiroia* [211], los daños por predación [212] y la radiación UV-b [213]. Todos estos factores incrementan sus efectos en combinación con la presencia de plaguicidas y fertilizantes [151, 204, 213 – 215], por lo cual un estudio sobre la fauna parasitaria y depredadora de las poblaciones estudiadas podría aportar valiosa información a los resultados obtenidos en este trabajo.

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 [216]. Aquí subyace la conjetura de que los anfibios adultos estudiados en este capítulo, atravesaron sus ciclos larvales en las mismas charcas donde se llevó a cabo el estudio del Capítulo I. Por lo tanto, y teniendo en cuenta los efectos que

ocasionaron las aplicaciones de plaguicidas en larvas, puede inferirse que el estado y condición de poblaciones de anfibios adultos está siendo determinado por las exposiciones que sufrieron en los estadios tempranos de desarrollo. Sin embargo, un sistema perturbado, tal como lo es un agroecosistema, con monocultivos y actividad sostenida en los últimos 20 años, cuenta con múltiples factores de estrés y no permite concluir que los plaguicidas sean el único factor inductor de los efectos sobre las densidades poblacionales y el estado de salud de las poblaciones (según lo expresan los índices de condición corporal y el desarrollo de anormalidades). Futuras investigaciones resultan necesarias para completar el complejo entramado de causas y efectos y poder comprender con mayor precisión el efecto de los plaguicidas sobre este nivel de organización biológica.

CAPÍTULO III

ENSAMBLES DE ANFIBIOS ADULTOS EN AGROECOSISTEMAS

INTRODUCCIÓN

Un agroecosistema se diferencia de un ecosistema natural porque necesita energía auxiliar que aumenta o subsidia la solar, como es el caso de los fertilizantes, plaguicidas, agua de riego y/o procesos dependientes de maquinaria; además de tener una baja diversidad apuntando a la producción de una o pocas especies que están sometidas a una selección artificial [217]. Aún siendo sistemas altamente perturbados, los agroecosistemas pueden ofrecer distintos hábitats y recursos para los anfibios y existen numerosos trabajos en la literatura que aportan evidencia a la distribución de especies en paisajes agrícolas de todo el mundo [14, 16 - 18, 57, 77, 218]. Sin embargo, estudios detallados sobre las comunidades alertan sobre la baja diversidad y densidad de especies en zonas agrícolas e indican que aunque contengan cursos de aguas, acequias y charcas, muchos anfibios no toleran las modificaciones provocadas por actividades agrícolas intensivas/extensivas y sostenidas en el tiempo [21, 22, 219].

Una comunidad se define, desde el punto de vista biológico, como un grupo de poblaciones que interactúan y se solapan en tiempo y espacio [220]. Aquellas comunidades en las que no pueden establecerse ni asegurarse las interacciones entre sus componentes son denominadas ensambles [91]. 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 [221]. Por su parte, la ecotoxicología de comunidades estudia los efectos de compuestos químicos sobre la abundancia, la diversidad y las interacciones de especies y ha adoptado algunas de las aproximaciones derivadas de la ecología de comunidades básica para predecir los efectos de contaminantes químicos [222]. 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 (puntos finales) 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 [91]. Sin embargo, el análisis de las comunidades desde el punto de vista ecotoxicológico enfrenta los mismos retos que han sido mencionados a lo largo de este trabajo de tesis: los resultados del efecto de plaguicidas en los niveles más altos de organización biológica resultan altamente complejos, variables y difíciles de interpretar [223]. En este sentido fueron propuestas algunas estrategias de implementación de monitoreos biológicos que contemplen adecuados puntos finales [224, 225], a su vez que involucren el complejo entramado de factores bióticos y abióticos capaces de estructurar a las comunidades. Además, fue sugerido que los estudios deben realizarse en un período prudencial que incluya a las posibles fluctuaciones temporales que naturalmente pueden acontecer a nivel de las comunidades [214].

Existe un gran consenso sobre el hecho de que las medidas de diversidad (o puntos finales en el marco de la ecotoxicología de comunidades) pueden ser usadas como indicadores del buen funcionamiento de un sistema [226]. Por otra parte, el tipo de medida de diversidad (riqueza, abundancia e índices de diversidad dominancia y equitatividad) ha constituido, histórica y actualmente, un amplio tema de debate [226 - 228]. Tradicionalmente, el número de especies de un área determinada (riqueza) fue una medida ampliamente utilizada dado que proporciona una expresión comprensible e instantánea de la realidad [229]. Sin embargo fue informado que la riqueza puede

conducir a aproximaciones erróneas y bajo este esquema fueron desarrollados distintos análisis, índices y modelos, basados en la distribución de abundancia (número de individuos) de especies [226]. En tanto, los índices de diversidad fueron frecuentemente sugeridos como un avance sobre los puntos finales ya mencionados (riqueza y abundancia) dado que ofrecen la posibilidad de integrar estas dos medidas [228, 229]. Finalmente, estudios detallados sobre los factores bióticos y abióticos resultaron esenciales en el diseño de monitoreos que abogan por distinguir los efectos de los contaminantes de aquellos producidos por la variación natural de las comunidades y los ensambles [91].

En los capítulos precedentes fue provista información sobre el efecto de plaguicidas a nivel individual a partir de ensayos de laboratorio y fueron comprobados los efectos sobre larvas de anfibios en escenarios de exposición a campo (Capítulo I), los cuales estarían influenciando, al menos en parte, la estructura de las poblaciones (Capítulo II). Se propone como objetivo del presente capítulo realizar un estudio a nivel de los ensambles de anfibios habitantes de nueve sitios que representan agroecosistemas con distinto uso del suelo, ubicados en el noreste de la Región Pampeana. Acompañando a ello se realizará una caracterización de los perfiles fisicoquímicos de los cuerpos de agua que se ubican en los agroecosistemas y una prospección de plaguicidas en agua y sedimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio (Fig. 16) se encuentra al noreste de la Provincia de Buenos Aires y pertenece a la Región Pampeana [230]. El clima es templado y húmedo, tipo B1 B'2 [231], con una temperatura media anual de 16 °C (medias mínima y máxima de 10,1 y

21,8 respectivamente) y una media de precipitación anual de 1000 mm con distribución bastante uniforme. Fueron seleccionados nueve sitios de estudio que representan agroecosistemas destinados al desarrollo de actividades típicas de la región, alguno de los cuales fueron escogidos para llevar a cabo los estudios que conforman el Capítulo I y II de esta tesis. Una somera descripción de estos sitios fue aportada oportunamente, pero a continuación se provee en detalle la descripción de la totalidad de los sitios que integran este capítulo.

Los Talas (LT) (34° 55' 54,6'' S 58° 04' 29,3'' O): este establecimiento de 250 Ha cuenta con parte de su suelo destinado a cultivos de soja, maíz y trigo; mientras que otra porción de mismo es destinada a cría de ganado vacuno. En ambos tipos de suelo se ubican cuatro charcas temporarias (una se encuentra en los potreros y tres están inmersas dentro de los cultivos). En este mismo sitio se llevó a cabo parte de la evaluación de efectos de aplicaciones de plaguicidas y también se realizó el estudio a nivel poblacional.

Urquiza (UZ) (34° 55' 13,5'' S 58° 06' 32,9'' O): el sitio cuenta con cultivos extensivos de hortalizas a cielo abierto y cultivos extensivos de maíz y soja. Aunque en sus alrededores existen superficies recorridas por cursos de agua que tienen corriente la mayor parte del año, fue considerada una única charca temporaria dado que de manera general los arroyos con cauce continuo no representan adecuados sitios de reproducción para los anfibios. Todos estos humedales se encuentran rodeados de cultivos a cielo abierto e invernaderos en los cuales se cultivan mayoritariamente hortalizas. En conjunto presenta características similares al establecimiento Los Talas pero sus alrededores carecen de suelos destinados a cría de ganado vacuno.

La Abundancia (LA) (34° 57' 36,4'' S 58° 04' 56,7'' O): en este sitio de 231 Ha se desarrollan cultivos extensivos de soja, maíz y trigo. En el mismo se localizan dos

charcas temporarias dentro del cultivo, además de un pequeño curso de origen artificial que es utilizado para drenar agua de los cultivos. Es un ambiente con características similares a los dos mencionados anteriormente dado que se encuentra influenciado por actividades hortícolas, aunque carece de sitios cercanos sin cultivos.

Remes (RM) (35° 01' 42,4'' S 57° 59' 44,1'' O): este establecimiento de 179 Ha cuenta con cultivos de soja, maíz y trigo. Tiene un pequeño curso de agua que cruza toda la extensión del campo y a menudo se ve interrumpido formándose consecuentemente pequeñas charcas temporarias en donde se reproducen los anfibios. En él se estudiaron dos de estas charcas que fueron las de mayor profundidad y por lo tanto las más estables. No se encuentran a su alrededor zonas urbanizadas ni cultivos hortícolas, pero a una distancia cercana a 500 m se encuentran potreros para cría de ganado.

Olmos (35° 03' 06,2'' S 57° 58' 35,2'' O): este sitio está rodeado de cultivos extensivos, su suelo es destinado al cultivo de maíz, soja y trigo y a una distancia de 700 m se encuentran grandes extensiones destinadas a cría de ganado vacuno. Este sitio está relacionado a un arroyo que durante el período de muestreo no tubo caudal, comportándose como una charca temporaria con escasa vegetación.

Humedal Ana (HA) (35° 04' 27'' S 57° 57' 23,5'' O): corresponde a un humedal que corre paralelamente a las antiguas vías del tren. En sus alrededores se encuentran terrenos destinados a ganadería y estando aislado de todos los cursos de agua de la región podemos inferir que no cuenta con exposición directa a plaguicidas.

Humedal Oliden (HO) (35° 07' 45,6'' S 57° 53' 11,4'' O): es uno de los humedales más grandes de la zona. Su suelo está destinado a la cría de ganado vacuno y no cuenta en sus alrededores con cultivos.

Referencia Santa Ana (SA) ($35^{\circ} 02' 23,2''$ S $57^{\circ} 48' 58,2''$ O) es un establecimiento de 142 Ha con actividad ganadera de carga mínima en el cuál no se desarrollan cultivos. En este sitio se realizó la comparación de los efectos de aplicaciones estudiados en el Capítulo I y el estudio de poblaciones perteneciente al Capítulo II. Se estudiaron dos charcas temporarias que se encuentran en el área de inundación del Arroyo El Pescado.

Referencia Quesada (QE) ($35^{\circ} 02' 23,2''$ S $57^{\circ} 48' 58,2''$ O): representa un gran humedal, sin incidencia de cultivos. Es un sitio en el cual se desarrolla cría de ganado y en general cuenta con similares características (distancia al río, elevación, etc.) a las del sitio denominado Santa Ana.

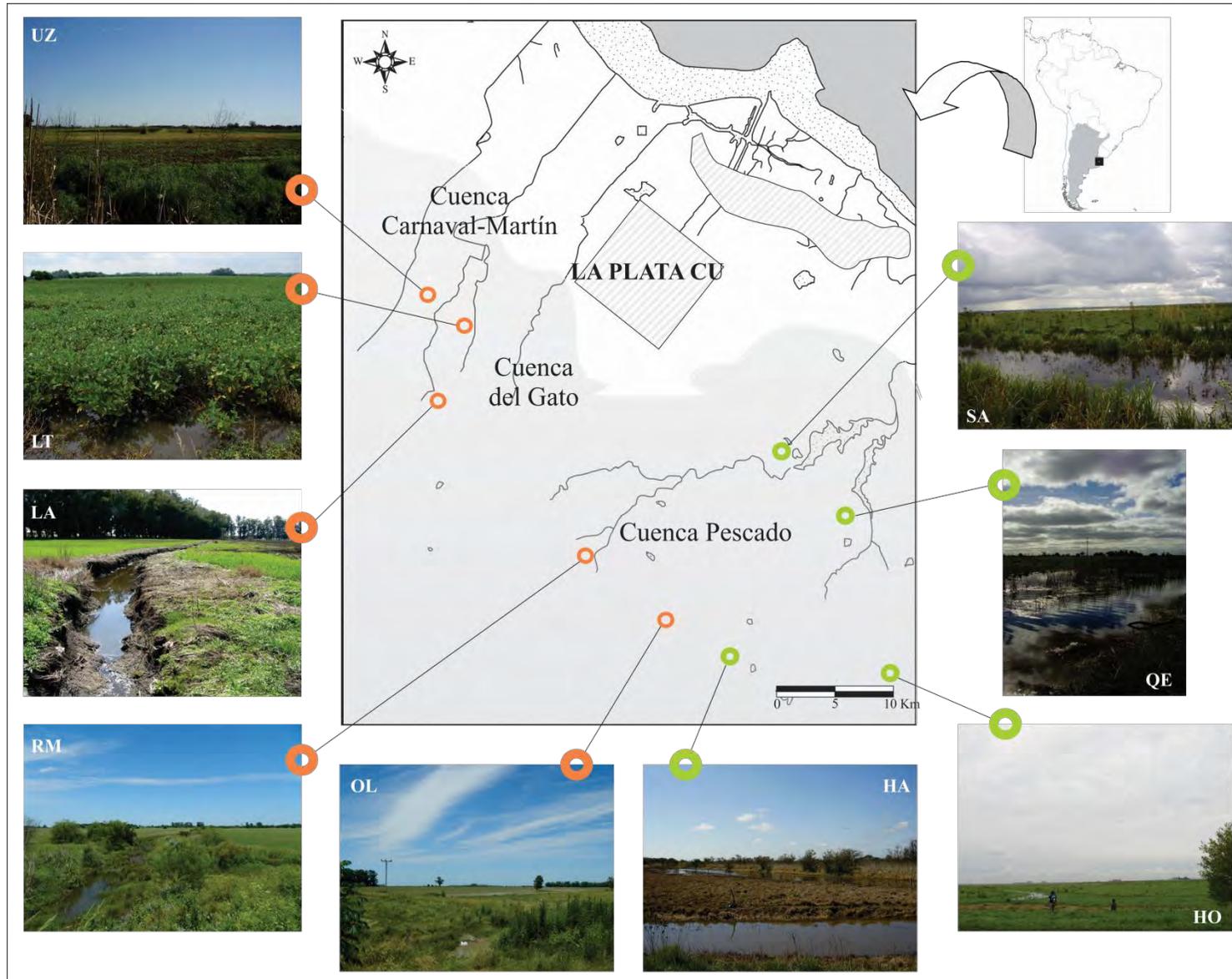


Figura 16: Área de estudio: En el mapa central se muestra la ubicación de los agroecosistemas estudiados. Las zonas rurales del partido de La Plata y alrededores se remarcan con sombreado gris y los centros urbanos más importantes de la zona se destacan con áreas rayadas. **LT:** establecimiento Los Talas. **UZ:** Urquiza. **LA:** establecimiento La Abundancia. **RM:** establecimiento Remes. **OL:** Olmos. **HA:** humedal Ana. **HO:** humedal Oliden. **SA:** establecimiento Santa Ana. **QE:** Quesada.

RELEVAMIENTO DE ENSAMBLES

Los monitoreos fueron conducidos con una frecuencia mayormente mensual en el período comprendido entre setiembre de 2009 y abril de 2012. La actividad de los anfibios (y con ello la probabilidad de registrarlos) depende de precisas condiciones climáticas [232], por lo que todos los sitios fueron relevados en una misma noche desde las 21 hasta las 04 h, contando por lo tanto con similares condiciones climáticas. Para evitar problemas metodológicos aportados por la variación diaria en la actividad de anfibios, los recorridos fueron realizados al azar [122]. Para cada sitio fueron considerados los cuerpos de agua como unidades de muestreo independientes.

En cada sitio y en cada unidad de muestreo fueron implementadas técnicas de relevamientos por encuentros visuales y relevamientos por censos auditivos [122] conducidos a través de transectas de recorrido fijo con una extensión de 50 x 2 m (triplicadas por unidad muestral) llevadas a cabo, siempre que fue posible, por una misma persona.

CARACTERIZACIÓN DE LOS CUERPOS DE AGUA

En cada ocasión de muestreo fueron tomadas las variables fisicoquímicas de los cuerpos de agua. Se midieron por triplicado pH, conductividad, oxígeno disuelto (OD) y temperatura empleando la metodología mencionada en el Capítulo I. Para realizar una caracterización de la flora macrófita componente de cada charca se procedió a la asignación específica de cada planta y se asignó una escala cuantitativa que adoptó valores de 1 a 7, donde 1 representa una vegetación monoespecífica y 7 la vegetación más diversa [121]. Además fueron consideradas variables espaciales: se estimó la superficie de las charcas y se determinó la profundidad media. Dado que el área de estudio y fundamentalmente los sitios cultivados RM y LT se localizan en un mosaico

de áreas cultivadas y no cultivadas (destinadas a cría de ganado vacuno o campos no explotados), se optó por establecer la variable distancia mínima a un área no cultivada. Esta última variable toma valores cuantitativos obtenidos a partir de imágenes satelitales obtenidas de Google Earth V 6.1.0.5001. Los valores se obtuvieron trazando una línea recta desde cada charca hasta el sitio no cultivado más próximo (de extensión superior a 200 Ha), que en la totalidad de los casos se trata de agroecosistemas destinados a cría de ganado vacuno. La información sobre los sitios sin cultivos fue provista por los propietarios y encargados de los agroecosistemas cultivados y por un muestreo de campo llevado a cabo en el área de estudio.

ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

Durante los meses de marzo de 2010 y febrero de 2011, fueron tomadas muestras de agua y sedimento de todas las charcas correspondientes a los nueve sitios mencionados. Adicionalmente fueron consideradas las muestras de glifosato y sedimentos analizadas en el Capítulo I. Las muestras de agua para análisis de insecticidas fueron tomadas en botellas de vidrio color caramelo de 250 ml y en el caso de las muestras para análisis de glifosato se tomaron en botellas plásticas de 100 ml. Las muestras de aguas fueron filtradas por 0,45 micrones y el filtrado fue sometido a extracción en fase sólida (SPE-C18), según el método descrito por Hernández *et al.* [233]. Los extractos fueron analizados por UPLC-MS/MS, usando dos transiciones de masa por compuesto, para cuantificar e identificar cada analito, las condiciones separativas y de detección fueron seleccionadas según los lineamientos del Método O-2060-01 de la USGS [234]. Los niveles de detección utilizados fueron 0,1 ng/L. Los análisis cromatográficos y la interpretación de los cromatogramas fueron realizados por profesionales del CIMA en el marco del Proyecto de Investigación PICT 38350 de la ANPCyT.

Para el caso de las extracciones de insecticidas en muestras de sedimento y de glifosato en muestras de agua, se siguió el mismo procedimiento desarrollado en el Capítulo I (ver pág. 26).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis exploratorio para evaluar el nivel del inventario (cantidad porcentual del número de especies muestreadas en relación al número de especies estimado) y determinar si los muestreos realizados fueron suficientes para obtener el registro de todas, o por lo menos la mayoría, de las especies que habitan cada uno de los sitios estudiados. Fueron empleados estimadores de riqueza esperada de tipo paramétrico (modelo logarítmico) [235] y no paramétrico (Chao 2 y Jackknife de Primer Orden) [236]. Además se construyeron curvas de acumulación de especies con un reordenamiento aleatorio repetido (100 repeticiones) empleando el programa EstimateS V 7.5 [237].

Para analizar diferencias en la riqueza de especies entre los sitios estudiados se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) [125, 127] con distribución de error de Poisson y función de enlace *log*. El uso de la tierra (agroecosistema cultivado o de referencia) y cada agroecosistema (LT, UZ, LA, RM, OL, HA, HO, SA y QE) fueron considerados como efectos fijos mientras que la ocasión de muestreo fue considerada como efecto aleatorio.

Para comparar patrones de abundancia de especies dentro de cada sitio fueron utilizadas gráficas de dominancia-diversidad o gráficas de rango-abundancia [238]. Las abundancias fueron convertidas a Log_{10} (número de individuos de cada especie/ número total de individuos).

La diversidad en cada uno de los sitios se analizó con el programa Species Diversity and Richness 4.0 [239]. Fueron tomados los índices de diversidad de Margalef (DMg), de dominancia de Simpson (D) y de equidad de Shannon-Wiener (H') [228,229]. Si bien utilizando las curvas de rango-abundancia puede hacerse una interpretación gráfica de los valores de dominancia y equidad, los índices aquí propuestos pueden ser sometidos a pruebas de hipótesis para verificar su significancia [228]. Para los índices D y H' fue realizada una estimación de los intervalos de confianza al 95% con el método Bootstrap [239]. Las significancias fueron probadas con un test de randomización entre pares de sitios [240].

Para analizar la variación en la composición de los ensambles y su relaciones con los parámetros ambientales se implementó un análisis multivariado utilizando el programa CANOCO versión 4.53 [241]. La variable de respuesta analizada fue la abundancia total de cada especie en cada uno de los relevamientos realizados. Las variables ambientales de los cuerpos de agua incluyeron: variables fisicoquímicas (pH, conductividad, OD y temperatura), variables espaciales (superficie y profundidad media), riqueza de especies de macrófitas y presencia y concentración de plaguicidas. En este último caso, dado que se trata de múltiples variables (una por cada plaguicida), se eligió representarla como un índice expresado por la siguiente relación:

$$PI = \frac{n \cdot \bar{x} C_i + (n \cdot \bar{x} C_{h+f})/10}{N}$$

Donde C_i representa a la concentración de insecticidas y C_{h+f} la concentración de herbicidas y fungicidas. n número de plaguicidas hallados y N es el número total de plaguicidas buscados.

Dado que las mediciones de plaguicidas no fueron realizadas para cada ocasión en que fueron conducidos los relevamientos, para el análisis multivariado fue tomado el valor de PI más cercano a la fecha de muestreo considerada. Los datos de todas las variables ambientales fueron normalizados debido a que poseen diferentes unidades de medida. Para evitar que la influencia de especies raras contribuya a una equívoca interpretación de los resultados, aquellas especies cuya abundancia relativa total presentó una contribución menor al 0,1 % fueron eliminadas del análisis.

Primeramente se realizó un análisis de correspondencia sin tendencia (*Detrended Correspondence Analysis - DCA*) para determinar si la variación de los datos responde de forma unimodal o lineal. Dependiendo de la longitud del gradiente se procedieron a realizar distintos tipos de análisis multivariante [241, 242]. Posteriormente se verificó la significancia global del modelo para el primer eje y para la suma de todos los ejes canónicos y se procedió a la selección de las variables ambientales que se correlacionaron de forma significativa con los ejes mediante un testeo de cada una de ellas ($p < 0,05$) utilizando el test permutaciones de Monte Carlo (499 permutaciones).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LOS ENSAMBLES

Un total de 13 especies fueron registradas en el conjunto de los sitios estudiados. Entre 10 y 12 conforman los ensambles de los agroecosistemas de referencia y entre 7 y 10 componen los ensambles pertenecientes a los agroecosistemas cultivados (Tabla 19). Las curvas de acumulación de especies alcanzaron una fase asintótica en todos los sitios de muestreo y dado que asumen similares valores dentro de los agroecosistemas cultivados y de referencia, son representadas gráficamente en la Figura 17. Los estimadores de riqueza mostraron un nivel de inventario de entre 84 y 100 % (Tabla 20).

Tabla 19: Composición de especies de los agroecosistemas estudiados correspondientes a sitios cultivados y de referencia.

Especies	CULTIVOS					REFERENCIA			
	LT	UZ	LA	RM	OL	HA	HO	SA	QE
<i>Rhinella arenarum</i>	x	x	x						
<i>Rhinella fernandezae</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Ceratophrys ornata</i>							x	x	
<i>Dendropsophus sanborni</i>				x			x	x	
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pseudis minutus</i>						x	x	x	x
<i>Scinax squalirostris</i>				x	x	x	x	x	x
<i>Scinax granulatus</i>	x		x	x	x	x	x	x	x
<i>Odontophrynus americanus</i>	x			x		x	x	x	x
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Leptodactylus latrans</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Leptodactylus latinasus</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Leptodactylus gracilis</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x

LT: establecimiento Los Talas. UZ: Urquiza. LA: establecimiento La Abundancia. OL: Olmos. HA: humedal Ana. HO: humedal Oliden. SA: establecimiento Santa Ana. QE: Quesada. Las especies resaltadas pertenecen a un único tipo de agroecosistema.

Tabla 20: Riqueza de especies observadas y estimadas y el nivel de inventario para cada sitio de muestreo.

	CULTIVOS					REFERENCIA			
	LT	UZ	LA	RM	OL	HA	HO	SA	QE
Especies observadas	9	7	8	10	8	10	12	12	10
Modelo Logarítmico	9,00	7,00	8,11	10,00	8,00	10,00	12,00	12,00	10,15
Chao 2	9,00	7,00	8,00	10,00	8,00	10,00	12,23	12,00	10,00
Jackknife I orden	9,00	8,33	8,13	10,00	8,15	10,00	13,13	12,00	10,34
Nivel del Inventario*	100	>84,0	>98,4	100	>98,1	100	>91,3	100	96,7

LT: establecimiento Los Talas. UZ: Urquiza. LA: establecimiento La Abundancia. OL: Olmos. HA: humedal Ana. HO: humedal Oliden. SA: establecimiento Santa Ana. QE: Quesada. * calculado como el porcentaje de las especies esperadas sobre el menor valor dentro de los estimadores.

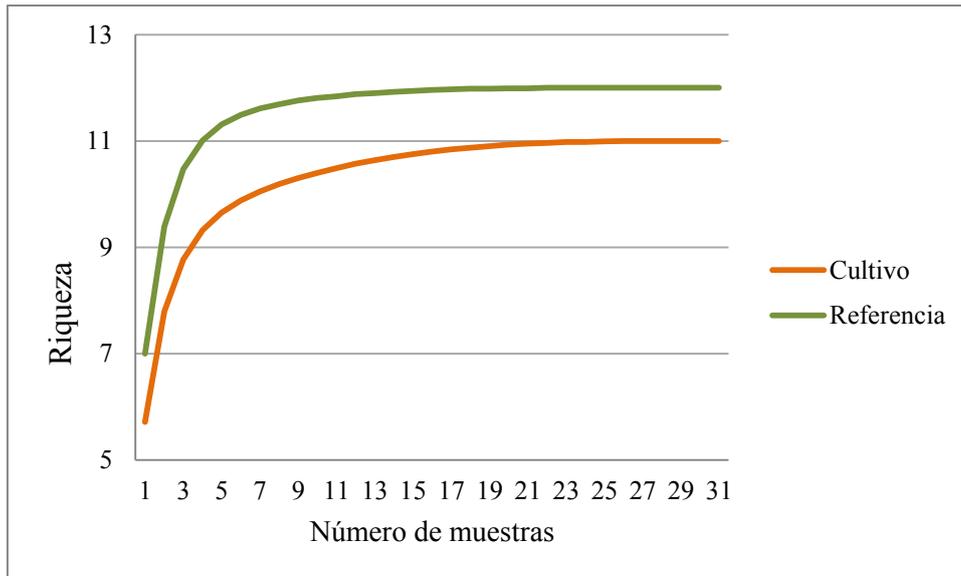


Figura 17: Curvas de acumulación de especies en ambos tipos de agroecosistemas.

Los resultados arrojados por el modelo lineal generalizado mixto (MLGM) expresan que el momento en que fueron realizados los relevamientos influye de manera significativa sobre la riqueza de especies ($\sigma^2 = 10.37 (\pm 3.22)$, $\chi^2_1 = 131.6$, $p < 0.001$). Mientras que el efecto de cada sitio (LT, UZ, LA, RM, OL, HA, HO, SA y QE) a través del período de muestreo no fue significativo ($\sigma^2 = 0.05 (\pm 0.22)$, $\chi^2_1 = 0.7$, $p = 0.12$). El modelo resultante expresa que no se registraron diferencias significativas en el número de especies en relación al uso del suelo ($Z = -1.881$ $p = 0.06$) (Fig. 18).

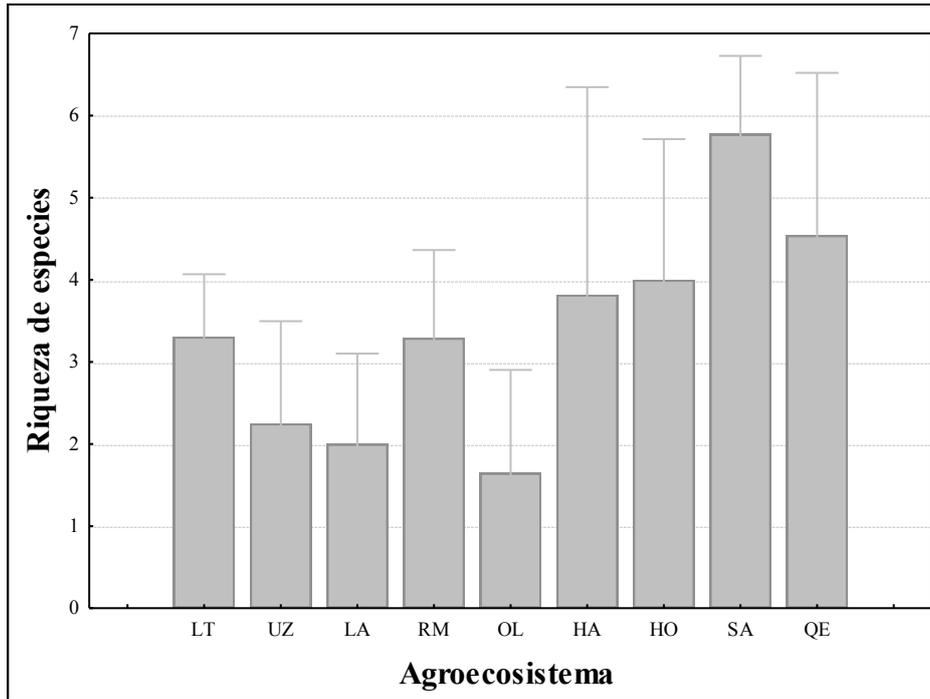


Figura 18: Promedios de la riqueza de especies en los nueve sitios y sus desvíos. Sitios cultivados: **LT:** establecimiento Los Talas, **UZ:** Urquiza, **LA:** establecimiento La Abundancia y **OL:** Olmos. Sitios de referencia: **HA:** humedal Ana, **HO:** humedal Oliden, **SA:** establecimiento Santa Ana y **QE:** Quesada.

Las gráficas de rango abundancia se muestran en la Figura 19. Una interpretación netamente descriptiva muestra que en dos sitios de referencia (HO y SA) las curvas tienen pendientes menores y asumen formas similares. *C. ornata* fue la especie menos abundante en ambas y si fuera removida del análisis las pendientes mostrarían mucha menos elevación. En los sitios de referencia HA y QE se ven pendientes un poco más pronunciadas y aunque comparten con HO y SA a *H. pulchellus* como la especie más abundante, en los dos primeros, esta especie mostró dominancia (Fig. 4). En los sitios cultivados (LT, UZ, LA, RM y OL) las curvas tuvieron diversas formas aunque *L. latrans* fue la especie más abundante mostrando una marcada dominancia en los sitios UZ, LA y OL. Esta especie estuvo precedida por *R. arenarum* e *H. pulchellus*. Las similares pendientes que muestran los sitios UZ, LA y RM resultan elevadas en comparación con todos los sitios de referencia y esto está relacionado en parte con la dominancia aportada por las tres especies mencionadas. Respecto del sitio LT, muestra

una forma de la curva similar a la presentada por los sitios de referencia relacionada a que no cuenta con especies dominantes.

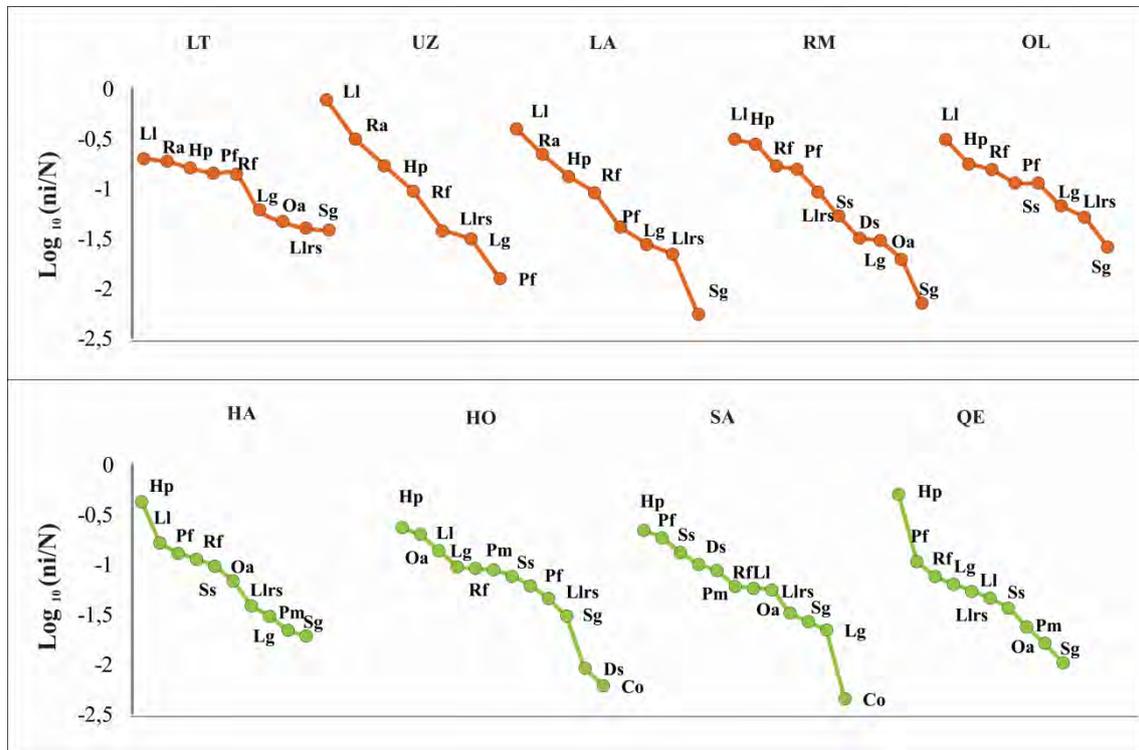


Figura 19: Curvas de dominancia-diversidad en los nueve sitios. En color anaranjado se muestran los sitios cultivados: **LT:** establecimiento Los Talas, **UZ:** Urquiza, **LA:** establecimiento La Abundancia, **OL:** Olmos. En color verde se muestran los sitios de referencia: **HA:** humedal Ana. **HO:** humedal Oliden. **SA:** establecimiento Santa Ana. **QE:** Quesada. **Hp:** *Hypsiboas pulchellus*, **Li:** *Leptodactylus latrans*, **Lg:** *Leptodactylus gracilis*, **Llrs:** *Leptodactylus latrans*, **Rf:** *Rhinella fernandezae*, **Ra:** *Rhinella arenarum*, **Ds:** *Dendropsophus sanborni*, **Sg:** *Scinax granulatus*, **Ss:** *Scinax squalirostris*, **Pm:** *Pseudis minutus*, **Co:** *Ceratophrys ornata*, **Oa:** *Odontophrynus americanus*.

Los resultados del análisis de diversidad muestran que los mayores valores del índice de diversidad de Margalef (DMg) pertenecen a los sitios de referencia HA, HO y QE al que se le suma el sitio cultivado OL y el menor valor corresponde al sitio cultivado LT (Tabla 21, Fig. 20). No ha sido puesta a prueba la significancia de este índice dado que los intervalos de confianza calculados hacen que no sea apropiada la implementación de este análisis.

La diversidad calculada según el índice de Shannon-Wiener (H') fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el sitio cultivados LT y en los sitios de

referencia HA y HO. Los menores valores obtenidos para este índice corresponden a los ensambles de los sitios cultivados UZ y LA (Tabla 21, Fig.20).

El análisis sobre la dominancia (D) mostró que los ensambles pertenecientes a los sitios HO y LT tienen valores significativamente altos de dominancia de especies ($p < 0,05$), en tanto que los ensamble más equitativos corresponden a los sitios cultivados LA y UZ y al sitio de referencia QE (Tabla 21, Fig. 20).

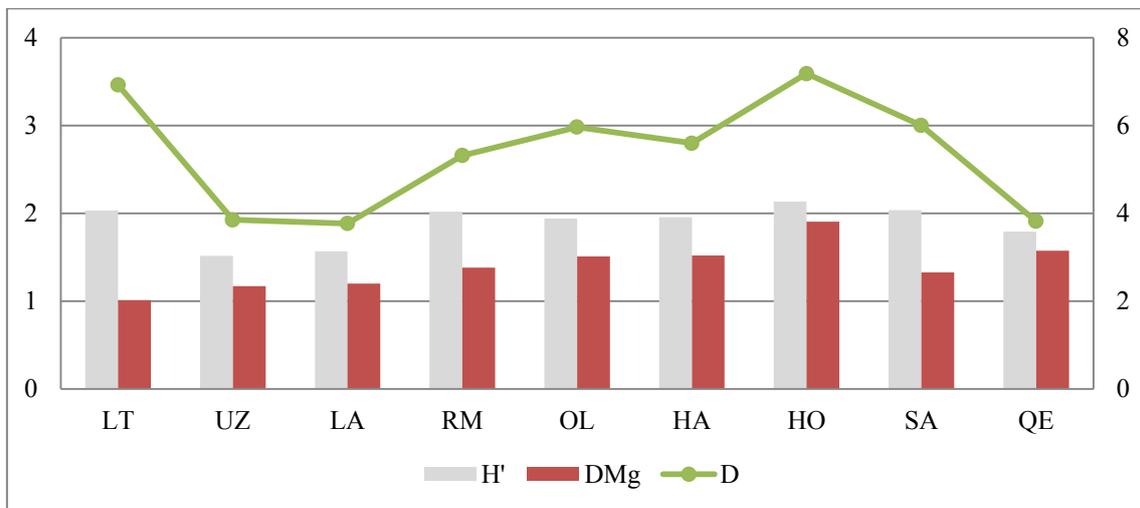


Figura 20: Índices de diversidad en los sitios de estudio. **DMg:** Índice de Margalef. **D:** índice de dominancia de Simpson. **H':** Índice de Shannon-Weaner. Sitios cultivados: **LT:** establecimiento Los Talas, **UZ:** Urquiza, **LA:** establecimiento La Abundancia y **OL:** Olmos. Sitios de referencia: **HA:** humedal Ana, **HO:** humedal Oliden, **SA:** establecimiento Santa Ana y **QE:** Quesada.

Tabla 21: Índices de diversidad de los sitios estudiados pertenecientes a agroecosistemas cultivados y de referencia.

	CULTIVOS					REFERENCIA			
	LT	UZ	LA	RM	OL	HA	HO	SA	QE
DMg	1,01 (1,01-1,01)	1,17 (0,97-1,17)	1,21 (1,02-1,22)	1,38 (1,38-1,38)	1,50 (1,50-1,50)	1,52 (1,52-1,52)	1,94 (1,73-1,94)	1,32 (1,32-1,32)	1,57 (1,57-1,57)
D	6,92 (6,72-7,08)	3,85 (3,30-4,37)	3,76 (3,38-4,23)	5,31 (4,91-5,70)	5,96 (5,04-6,69)	5,59 (4,86-6,26)	7,18 (6,26-7,84)	6,00 (5,77-6,20)	3,82 (3,20-4,49)
H'	2,03 (2,01-2,05)	1,51 (1,37-1,61)	1,56 (1,45-1,64)	2,01 (1,92-2,07)	1,94 (1,82-2,01)	1,95 (1,86-2,04)	2,14 (2,04-2,19)	2,03 (2,01-2,06)	1,79 (1,65-1,92)

Sitios cultivados: **LT:** establecimiento Los Talas, **UZ:** Urquiza, **LA:** establecimiento La Abundancia y **OL:** Olmos. Sitios de referencia: **HA:** humedal Ana, **HO:** humedal Oliden, **SA:** establecimiento Santa Ana y **QE:** Quesada. **DMg:** Índice de Margalef. **D:** índice de dominancia de Simpson. **H':** Índice de Shanon-Weaner.

CARACTERIZACIÓN DE LOS CUERPOS DE AGUA

Los resultados de las variables tomadas en cada ocasión de muestreo se detallan en la Tabla 22. Cabe destacar que en algunas oportunidades las charcas se encontraron secas al momento del muestreo por lo que puede diferir el número de veces en que estos parámetros fueron medidos.

ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

Se determinó la presencia de plaguicidas en muestras de agua de los ambientes estudiados entre los que se encuentran insecticidas (carbaril, imidacloprid, dimetoato, malatión, carbofurán, diazinon), fungicidas (epoxiconazol, triticonazol, tebuconazol, piraclostrobin, metconazol, cresoxim-metilo), herbicidas (imazaquim, imazapic, imazamox, 2,4 D, atrazina, clorimuron-etílico, MCPA, cianazina, metsulfuron, glifosato y AMPA) y coadyuvantes (Piperonil butóxido). Las concentraciones no exceden en ninguno de los casos los 124 ng /L salvo para el glifosato y AMPA que asumieron valores entre 3,5 y 327,2 µg /L. En los sitios de referencia se detectó menos variedad de compuestos y en general en menor concentración que en zonas cultivadas. En HO y SA se detectaron 12 y 13 de los 27 plaguicidas estudiados, mientras que en HA y QE se detectaron 21 y 23 respectivamente. En los sitios cultivados todos los plaguicidas buscados fueron detectados. El glifosato no estuvo presente en las muestras de agua de los sitios de referencia. Los sedimentos de los sitios de referencia tampoco contienen cipermetrina, aunque se detectaron los insecticidas clorpirifós y endosulfán. Contrariamente, se registraron concentraciones comparativamente importantes de los plaguicidas estudiados en todos los sitios cultivados (Tabla 23).

Tabla 22: Valores medios y desvíos estándar (entre paréntesis) de los parámetros que caracterizan las charcas ubicadas en agroecosistemas cultivados y de referencia.

SITIO	Charca	pH	Conductividad (mS/cm)	OD (mg/L)	T (°C)	Área (m²)	Profundidad (cm)	R	DM SC (Km)
Los Talas	LT 1	7,10 (0,31)	0,22 (0,20)	9,32 (1,12)	13,9 (5,9)	162,8 (68,9)	44,6 (22,3)	1	0,29
	LT 2	6,53 (0,36)	0,19 (0,22)	9,43 (1,25)	12,9 (7,5)	135 (40,5)	52,9 (29,3)	2	0,31
	LT 3	7,19 (0,37)	0,18 (0,17)	9,12 (1,22)	13,9 (6,4)	131 (44,6)	46,7 (12,6)	1	0,47
	LT 4	6,78 (0,42)	0,19 (0,17)	8,32 (1,38)	12,1 (3,1)	150 (61,5)	48,4 (15,2)	4	0
Urquiza	UZ 1	6,78 (0,38)	0,21 (0,16)	9,42 (1,34)	12,3 (4,1)	98,32 (66,5)	46,7 (12,6)	2	2,14
La Abundancia	LA 1	6,92 (0,25)	0,19 (0,19)	9,12 (1,28)	13,9 (6,3)	103,4 (57,5)	48,4 (15,2)	1	2,52
	LA 2	6,99 (0,30)	0,15 (0,11)	10,17 (1,05)	12,4 (6,7)	126,9 (51,6)	45,3 (12,4)	1	3,36
Remes	RM 1	7,02 (0,22)	0,23 (0,15)	10,03 (2,12)	13,8 (7,5)	73 (53,5)	57,9 (19,6)	2	0,94
	RM 2	7,06 (0,29)	0,28 (0,32)	9,5 (2,12)	10,7 (6,4)	99 (61,3)	53,9 (11,4)	3	0,36
Olmos	OL 1	6,83 (0,38)	0,27 (0,09)	9,2 (2,31)	11,9 (6,9)	121,12 (71,43)	51,73(13,7)	3	1,59
Humedal Ana	HA 1	6,93 (0,41)	0,21 (0,12)	9,31 (1,51)	10,9 (7,6)	132,7 (63,61)	48,7 (12,6)	5	0
Humedal Oliden	HO 1	7,13 (0,31)	0,18 (0,12)	9,43 (1,97)	12,9 (6,4)	167,4 (71,93)	48,4 (13,2)	6	0
Santa Ana	SA 1	6,94 (0,33)	0,17 (0,12)	9,22 (2,12)	11,7 (7,4)	114,6 (51,9)	46,3 (17,2)	7	0
	SA 2	7,09 (0,27)	0,12 (0,14)	9,30 (2,02)	12,5 (6,3)	104,9 (46,3)	41,7 (11,6)	6	0
Quesada	QE 1	7,02 (0,34)	0,20 (0,17)	9,31 (1,92)	12,9 (6,9)	126,3 (56,06)	45,4 (10,7)	6	0

R: riqueza de especies de macrófitas. **DMSC:** distancia mínima a otro sitio no cultivado.

Tabla 23: Valores medios de concentraciones de plaguicidas en agua y sedimento pertenecientes a charcas ubicadas en agroecosistemas cultivados y de referencia.

Plaguicida	LT 1	LT 2	LT 3	LT 4	UZ 1	LA 1	LA 2	RM 1	RM 2	OL 1	HA 1	HO 1	SA 1	SA 2	QE 1
Imazapic	6,3	8,6	nd	nd	4,0	2,1	6,9	10,7	9,3	10,0	1,2	nd	nd	nd	0,5
Imazamox	3,0	0,2	3,4	nd	0,0	0,9	0,0	4,6	5,8	1,0	2,1	nd	nd	nd	1,8
2,4D	46,7	26,5	114,7	nd	111,3	13,4	16,4	20,2	86,5	50,0	3,5	10,3	4,7	6,8	7,4
Atrazina	9,5	23,0	25,9	1,2	10,0	7,6	12,0	44,9	20,6	5,0	9,8	3,5	8,2	8,9	12,3
Clorimuron etil	9,7	nd	7,3	3,6	7,2	0,7	nd	nd	nd	8,0	nd	1,4	1,4	nd	0,9
Imazaquim	12,0	7,0	15,1	16,1	10,4	1,4	9,0	0,9	1,4	24,3	1,2	1,6	1,6	nd	6,7
MCPA	41,1	4,3	25,2	8,3	10,0	16,9	0,9	17,3	16,9	9,5	nd	nd	nd	nd	15,7
Cianazina	19,0	nd	23,5	10,7	51,4	0,3	10,0	9,0	6,8	10,3	17,5	nd	nd	nd	1,9
Metsulfuron	0,5	0,9	5,3	2,4	4,1	0,2	2,2	1,3	2,1	nd	0,6	nd	nd	1,3	2,3
Glifosato†	165,4	228,4	327,2	12,3	154,6	36,4	25,3	3,5	12,7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AMPA†	42,6	36,8	34,5	26,0	37,2	13,4	12,6	44,2	51,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Epoxiconazol	9,3	9,0	14,8	nd	10,3	10,9	2,5	4,3	5,0	8,0	7,9	nd	nd	nd	4,2
Triticonazol	10,1	10,1	22,5	6,0	12,1	1,8	5,4	12,8	13,5	17,0	4,8	nd	nd	nd	8,9
Tebuconazol	12,8	10,3	37,8	nd	30,0	48,1	19,3	12,6	27,5	25,6	16,1	3,5	1,4	5,9	31,5
Piraclostrobin	1,9	nd	1,4	nd	1,3	0,5	2,1	0,5	0,9	nd	1,2	nd	nd	nd	3,0
Cresoxim metil	18,4	6,5	34,0	5,4	15,4	10,1	7,3	19,6	9,6	8,1	5,0	3,7	6,3	8,9	16,2
Metconazole	6,1	1,3	10,5	nd	5,4	10,5	4,1	9,1	10,5	6,5	10,2	6,7	7,2	8,0	4,3
Pirerónil-butoxido	3,7	nd	3,0	nd	0,8	2,7	3,0	9,2	0,7	0,9	0,7	0,2	3,2	1,6	3,0
Carmaril	6,4	nd	5,0	nd	15,4	6,0	0,0	7,8	8,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Malatión	1,0	nd	8,5	nd	5,3	4,2	0,5	8,2	9,2	nd	0,7	nd	0,1	nd	1,9
Imidacloprid	89,1	57,0	124,0	22,3	44,6	34,2	31,1	4,2	5,8	75,0	31,0	34,2	43,1	22,5	59,0
Dimetoato	8,7	1,0	16,2	0,3	13,7	1,1	0,0	2,1	0,3	nd	0,8	nd	nd	nd	4,4
Diazinon	6,1	4,8	5,8	1,2	1,5	2,6	2,0	6,13	5,4	2,4	0,9	2,1	nd	1,5	3,1
Carbofurán	19,1	15,5	25,5	0,9	18,9	3,7	3,0	16,3	20,4	13,6	5,4	1,2	1,2	3,9	12,3
Cipermetrina*	10,2	16,3	53,2	nd	16,3	12,2	27,2	4,1	8,9	16,0	nd	nd	nd	nd	nd
Endosulfán*	30,4	41,2	48,5	25,8	50,2	56,2	74,9	115,2	42,1	24,3	9,4	nd	nd	nd	1,6
Clorpirifós*	1,4	2,8	4,9	nd	Nd	4,3	2,8	3,2	8,9	nd	2,1	nd	nd	nd	1,3

*Determinación en muestras e sedimento, las concentraciones se encuentran en µg/Kg. † Concentraciones en µg/L. Las demás determinaciones corresponden a muestras de agua y la concentración expresada es ng/L.

ANÁLISIS MULTIVARIADO

El ACD mostró una longitud de gradiente de 2,48 por lo que el análisis multivariado fue conducido a través de un análisis de redundancia (ARD). El ARD llevado a cabo con todas las variables consideradas determinó que cuatro de ellas estuvieron significativamente correlacionadas con los ejes canónicos según el *test* de permutaciones de Monte Carlo: la temperatura (T) (F ratio = 26,17; $p < 0,01$), el índice de plaguicidas calculado (PL) (F ratio = 19,93; $p < 0,01$), la riqueza de macrófitas (R) (F ratio = 4,59; $p < 0,01$) y la distancia a sistemas no cultivados (DMSC) (F ratio = 3,10; $p < 0,01$). Utilizando estas variables fueron construidos el primer y segundo eje canónicos, los cuales explicaron el 97,3 % (Tabla 24) de la variación total entre las especies y el ambiente. El *test* de significancia global mostró que la misma se cumplía tanto para el primer eje canónico (F ratio = 33,38; $p < 0,01$) como para la suma de todos los ejes (F ratio = 8,48; $p < 0,01$). Los valores con los cuales las variables se relacionan con el primer y segundo eje canónico se muestran en la Tabla 24. Según estos valores pueden observarse dos agrupamientos para los sitios y días de muestreo y dos para las especies.

En la Figura 21 se puede observar que los grupos A y B tienen una distribución en diagonal que está relacionada con la temperatura (T) y esto determina los gradientes de abundancias que decrecen conforme decrece este parámetro ambiental. La separación de estos dos grupos está dada por la riqueza de especies de macrófitas (R) cuyos mayores valores caracterizan al grupo B que incluye a las charcas de sitios sin cultivos (HO, QE y SA) mientras que el índice de plaguicidas (PI) y la distancia a sitios sin cultivar (DMSC) se encuentran relacionados positivamente al agrupamiento A conformado por los sitios con cultivos (UZ, LT y LA). En medio de estos dos grupos se encuentran algunos muestreos correspondientes a los sitios OL, RM, HA, HO y QE los

cuales presentan valores intermedios de variedad y concentración de plaguicidas (PI), así como también valores intermedios de distancias a sitios no cultivados, de manera que funcionan como sitios de transición entre los sistemas altamente perturbados y los sitios de menor disturbio.

En la Figura 22 puede apreciarse que las especies ocupan aéreas relacionadas a valores de temperatura crecientes. Puede distinguirse la conformación del grupo *a* (*L. latinaus* y *R. arenarum*) cuyas abundancias están relacionadas a sitios cultivados. En oposición se encuentra el grupo *b*, conformado por *P. minutus*, *Scinax squaliristris* y *D. sanborni* cuyas mayores abundancias caracterizan los ensambles pertenecientes a los sitios de referencia relacionadas positivamente con los valores de R y negativamente con valores de PI y DMSC.

Tabla 24: Resultados del ACP para las variables de caracterización de las charcas .

Variables	Componentes principales	
	CP 1	CP 2
T	0,66	-0,33
PI	0,22	-0.28
R	0.42	0,58
DMSC	-0.39	-0,43
<i>Porcentaje de varianza explicada</i>	68,1	28,2
<i>Porcentaje acumulado</i>	68,1	97,3

CP 1: primer componente principal. **CP 2:** segundo componente principal. **T:** temperatura. **OD:** oxígeno disuelto, **R:** riqueza de especies de macrófitas. **DMSC:** distancia mínima a otro sitio no cultivado.

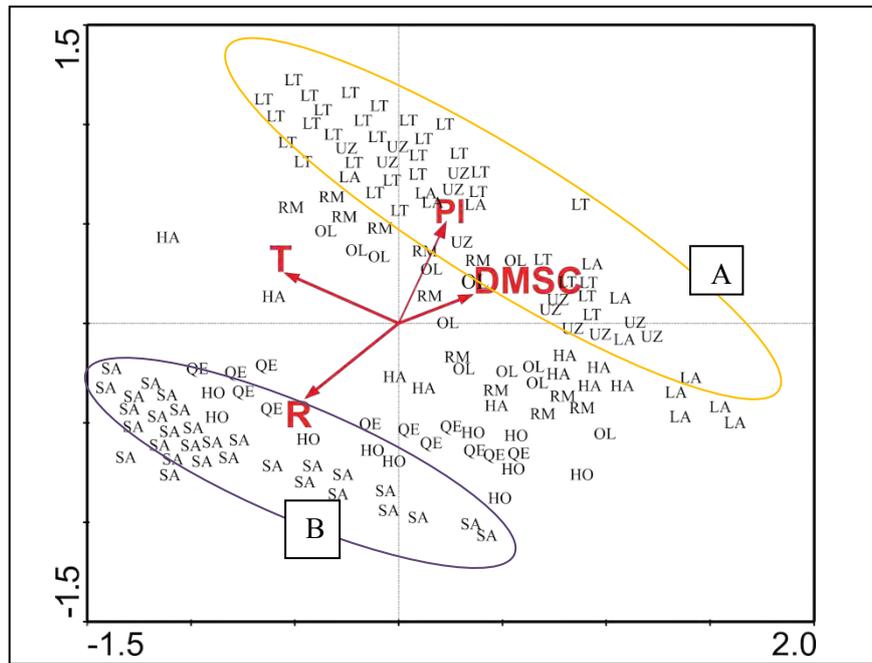


Figura 21: Scatter plot de los sitios de muestreo obtenido a través del análisis ADR. Sitios cultivados: **LT:** establecimiento Los Talas, **UZ:** Urquiza, **LA:** establecimiento La Abundancia y **OL:** Olmos. Sitios de referencia: **HA:** humedal Ana, **HO:** humedal Oliden, **SA:** establecimiento Santa Ana y **QE:** Quesada. **T:** temperatura, **PI:** índice de plaguicidas calculado, **R:** riqueza de macrófitas, **DMSC:** distancia a sistemas no cultivados, **A:** Grupo A, **B:** grupo B.

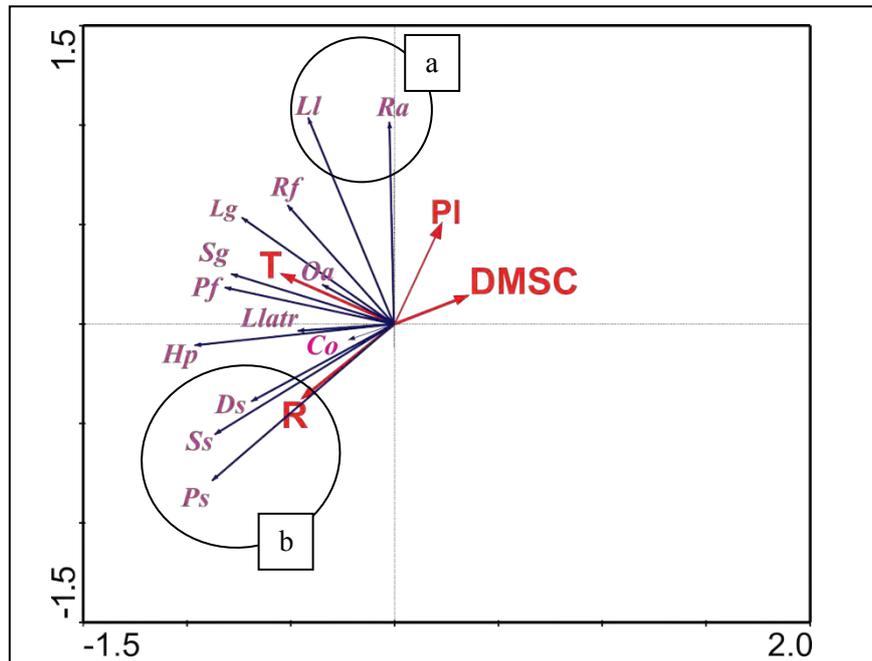


Figura 22: Scatter plot de las especies para todos los muestreos obtenido a través del análisis ADR. **Hp:** *Hypsiboas pulchellus*, **Li:** *Leptodactylus latinasus*, **Lg:** *Leptodactylus gracilis*, **Llatr:** *Leptodactylus latrans*, **Rf:** *Rhinella fernandezae*, **Ra:** *Rhinella arenarum*, **Ds:** *Dendropsophus sanborni*, **Sg:** *Scinax granulatus*, **Ss:** *Scinax squalirostris*, **Pm:** *Pseudis minutus*, **Oa:** *Odontophrynus americanus*. **T:** temperatura, **PI:** índice de plaguicidas calculado, **R:** riqueza de macrófitas, **DMSC:** distancia a sistemas no cultivados, **a:** grupo a, **b:** grupob.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La manera más sencilla de caracterizar una comunidad o ensamble es por medio del número de especies presentes, es decir, a través de su riqueza [229]. Rapport *et al.* [243] incluyen la reducción de la riqueza de especies como uno de los indicadores generales de que un ecosistema manifiesta un síndrome de “insuficiencia” (*ecosystem distress síndrome*). Sin embargo este parámetro no fue suficientemente útil para explorar diferencias entre los ensambles aquí estudiados si se tiene en cuenta que, en valores absolutos, los sitios cultivados sumaron un total de 10 especies mientras que los sitios de referencia alcanzaron a 12. Poniendo en consideración cuáles especies conforman estos ensambles y no cuántas, las interpretaciones pueden arrojar un poco más de claridad. Ha sido mencionado que las especies más sensibles a un contaminante tienden a desaparecer de una comunidad expuesta a una determinada fuente de contaminación. Asimismo, cabe esperar que las especies raras sean las primeras en ser eliminadas de sitios disturbados [222]. La ausencia de una especie en un sitio contaminado a menudo supone una consecuencia de la contaminación. Alternativamente, la ausencia de esta especie puede ser el resultado de una importante cantidad de factores bióticos y abióticos no relacionados con el estrés [226]. En este sentido es apropiado analizar la ausencia de dos especies en los agroecosistemas con mayor variedad y concentración de plaguicidas. *Pseudis minutus* es abundante en el área de estudio [96, 244], por lo que su ausencia en los sistemas cultivados estudiados (UZ, LT, LA, RM y OL) podría estar relacionada a los efectos de los plaguicidas como también a la presencia de distintos factores de estrés presentes en estos agroecosistemas con cultivos. Estudios sobre la sensibilidad a plaguicidas de *P. minutus* proveerán información sobre la relación de esta especie con ambientes perturbados por presencia de plaguicidas. La segunda especie ausente en todos los sitios cultivados y en los dos sitios de referencia con una mayor

variedad y concentración de plaguicidas (HA y QE) es *C. ornata*. Este anfibio ha sido recientemente categorizado como vulnerable, estando esta categoría determinada por la disminución en la frecuencia de los registros acontecidos en la Región Pampeana en los últimos 20 años. Como factores causantes de la retracción poblacional de *C. ornata* se mencionan las modificaciones dadas por la agricultura y los procesos de urbanización [245]. Sin embargo estudios realizados en el noreste de la Provincia de Buenos Aires, zona predominantemente sojera, indican que las poblaciones son abundantes en cortos períodos donde la reproducción explosiva característica de esta especie hace que pueda ser detectada [246]. Aunque no se dispone de datos sobre la sensibilidad de esta especie a plaguicidas cabe esperar que las poblaciones de *C. ornata* en el área de estudio que esta tesis abarca estén siendo afectadas por las prácticas agrícolas y los plaguicidas asociados a las mismas.

R. arenarum fue la única especie representada en los sitios cultivados LT, UZ y LA, que estuvo ausente en los sitios de referencia. *R. arenarum* tiene hábitos peri domésticos [96, 247]. Su ausencia no estaría relacionada al desarrollo de prácticas agrícolas, sino a que los demás sitios de estudio se encuentran alejados de ambientes urbanizados. Esta observación está apoyada por la ausencia de *R. arenarum* en dos de los sitios cultivados (RM y OL) y en grandes extensiones de pastizal de áreas protegidas de la provincia de Buenos Aires [244].

Los patrones de abundancia permitieron establecer que la especie más abundante en los sitios cultivados es *L. latinasus*, seguida por *H. pulchellus* en el caso de RM y OL, y por *R. arenarum* en LT, LA y UZ. La mayor abundancia en todos los sitios de referencia (HA, HO, SA y QE) se obtuvo para *H. pulchellus*. Estos resultados indican que *L. latinasus* muestra una preferencia por los sitios con cultivos lo cual podría

relacionarse a sus hábitos cavícolas [12] y a la posibilidad de refugio que proporciona un cultivo.

Cuando se analizan la forma y la pendiente de las curvas rango-abundancia pueden verse dos tendencias. En primer lugar los ensambles que mostraron una dominancia marcada de especies son aquellos pertenecientes a los sitios cultivados y de referencia con alta presencia de plaguicidas (UZ, LA, RM, OL, HA y QE), exceptuando el sitio LT. En segundo lugar las curvas que mostraron mayor pendiente fueron aquellas pertenecientes a los sitios cultivados (UZ, LA, RM, OL) entre las que tampoco se incluye al sitio LT. Las curvas rango-abundancia pueden ser útiles como una aproximación gráfica a los modelos de abundancia de especies desarrollados para explicar la estructura de las comunidades [226]. Una gran variedad de modelos fueron desarrollados dentro de la teoría ecológica, siendo los más frecuentemente usados aquellos que involucran la serie geométrica, la serie logarítmica, la serie log-normal y la serie de la vara quebrada [226, 248 - 250]. Un ensamble cuyas curvas de rango-abundancia muestran la presencia de especies dominantes y pendientes pronunciadas responde gráficamente a una distribución de la serie geométrica, mientras un ensamble con mayor equitatividad de especies y menor pendiente responde a una serie log-normal [226, 229]. Los datos obtenidos en los ensambles estudiados no permitieron realizar el ajuste de los mismos a las distribuciones teóricas, por lo tanto tampoco poner a prueba la significancia del ajuste dado impedimentos determinados por el número naturalmente bajo de especies en los ensambles [251]. Sin embargo los resultados muestran que los ensambles establecidos en sitios expuestos a una variada cantidad de plaguicidas y en concentraciones mayores tienden hacia una distribución geométrica, mientras que aquellos con menor exposición tienden hacia una distribución normal logarítmica. La teoría ecológica ha establecido que las comunidades sometidas a contaminación o estrés

se caracterizan por un cambio en la abundancia de sus especies, que generalmente cambian desde distribuciones normales logarítmicas para tender hacia series geométricas [226], lo cual está en acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio.

Según el índice de Shannon-Wiener, los ensambles más diversos corresponden a los sitios de referencia HO y SA al que se le suma el sitio cultivado OL. La mayor diversidad según el índice de Margalef se obtuvo en los sitios de referencia HA, HO y SA y en el sitio cultivado OL. Estas diferencias expresadas en las medidas de diversidad se deben a las distintas ponderaciones que los índices asumen sobre la riqueza y la abundancia de especies. El índice de Margalef expresa la diversidad a través de la medición de la riqueza específica y supone que existe una relación funcional entre el número de especies y el número total de individuos [228], mientras que el índice de Shannon-Wiener es una relación entre los valores de riqueza de especies y de uniformidad de abundancias de cada especie. Este último es un índice de equitatividad en donde los ensambles más diversos serán aquellos que cuenten con mayor número de especies (riqueza), pero también cuyas abundancias de estas especies se presenten de manera equitativa [228]. Las limitaciones en el uso de estos y otros índices para expresar y analizar diferencias en ensambles sometidos a estrés ambiental, fue mencionada por varios autores [91]. De allí surgen las recomendaciones sobre la realización de generar estudios que incluyan distintas medidas de diversidad.

Los análisis químicos de plaguicidas evaluados muestran perfiles con 27 compuestos entre los determinados en agua y en sedimentos, los que conjuntamente corresponden a 9 insecticidas, 11 herbicidas, 6 fungicidas y un excipiente. Las concentraciones de los mismos en agua no exceden el orden de los ng /L, exceptuando el caso del glifosato el cual fue detectado en un intervalo entre 3,5 y 228, 4 µg /L. En sedimentos, los valores no excedieron los 130 µg /Kg. Si bien las concentraciones en la

fracción soluble de agua de las charcas se encuentran, de manera general, por debajo de los niveles de efecto [27], la presencia de estas mezclas complejas alertan sobre los peligros potenciales en los ambientes acuáticos de agroecosistemas y zonas de influencia, dado que incluso se han detectado algunos compuestos en charcas distantes a varios kilómetros de zonas cultivadas. La exportación de plaguicidas ha sido reconocida en diversos trabajos y fue asociada al transporte y deposición por acción del viento o bien por acción de depósitos atmosféricos que pueden trasladarse a miles de kilómetros por la atmósfera y alcanzar la corteza terrestre por acción de lluvias [252 – 255].

Si bien fue registrada la presencia de herbicidas, fungicidas e insecticidas, estos últimos merecen fundamental atención dada la alta toxicidad que tienen sobre los anfibios en comparación con los demás tipos [27, 44]. El imidacloprid considerado moderadamente peligroso por la OMS [44], fue el insecticida con mayor frecuencia de aparición y el que presentó mayor concentración en las muestras de aguas. Esto se encuentra en correspondencia con lo mencionado por [11] que refieren a este agroquímico como el insecticida más usado en los cultivos intensivos de la región, sobre todo en aquellos que se desarrollan bajo cubierta. El carbofurán, considerado altamente peligroso por OMS [44], es también un insecticida de amplio uso en la región, sobre todo en cultivos intensivos, aunque su uso tiene importantes restricciones dadas la elevada toxicidad y persistencia [11]. El dimetoato y el carbamil, ambos moderadamente peligrosos [44] son poco utilizados en cultivos intensivos, aunque su aparición frecuente en las muestras puede estar relacionada a que el primero es empleado por productores de bajo poder adquisitivo que lo utilizan en grandes cantidades, mientras que el carbamil es utilizado para control de plagas en cultivos extensivos.

Cabe destacar que las mayores concentraciones en agroecosistemas cultivados de determinados plaguicidas (cipermetrina, endosulfán, clorpirifós, glifosato y 2,4D) están dadas porque algunas de las muestras se analizaron en asociación con eventos de aplicación, incluso fueron asociados a estas concentraciones efectos letales y subletales estudiados en el Capítulo I. Es necesario tener en cuenta que los niveles de concentración de estos plaguicidas pueden verse aumentados si se consideraran muestras postaplicación, en los sitios OL y UZ en los cuales no fue posible determinar la asociación de la concentración de plaguicidas a la ocurrencia de un evento de aplicación inmediato.

Tomando en consideración las detecciones de plaguicidas en los nueve sitios estudiados, junto a los parámetros de caracterización de los cuerpos de agua, se pudo demostrar que las mayores abundancias se registran en aquellos agroecosistemas donde la concentración de plaguicidas fue escasa tanto cuali como cuantitativamente (SA y HO). Los ensambles con abundancias intermedias y con especies dominantes fueron los sitios sin cultivos HA y QE, que aún con presencia de plaguicidas cuentan con ensambles menos perturbados (desde el punto de vista de la riqueza y la abundancia de especies). Como fue mencionado a lo largo de toda la tesis, un agroecosistema cuenta con múltiples factores de estrés y en ello puede radicar una explicación plausible a los resultados obtenidos. Ha sido demostrado que los anfibios pueden colonizar áreas desde otras cercanas consideradas como “fuentes” [256, 257]. En este sentido interesa destacar que dentro de los sitios cultivados, los ensambles de RM y LT mostraron mayores riquezas y abundancia de especies, lo cual puede estar relacionado a la cercanía a áreas sin cultivos que funcionan como fuente proveyendo a los ensambles de nuevos individuos colonizadores. Esto se hizo evidente en el ensamble del sitio LT, el cual cuenta con charcas dentro de los potreros aledaños a los cultivos. Estas charcas, aún

contaminadas con plaguicidas, cuentan con algunos indicadores de un mejor estado: no reciben la aplicación directa de plaguicidas y por lo tanto las concentraciones de los mismos resultan inferiores, tienen mayor riqueza de macrófitas, son sitios preferidos para la reproducción los cuales tienen mayor cantidad de puestas (Capítulo I), y en consecuencia mayor abundancia de larvas. Además no fueron registrados en ellas, efectos de aplicaciones de plaguicidas ocurridos en cultivos aledaños sobre larvas (Capítulo I). Fue demostrado que la riqueza de especies vegetales de charcas y cuerpos de agua se encuentra relacionada con la riqueza y abundancia de especies de anfibios [20, 152] lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos en este capítulo. Por lo antes expuesto, puede establecerse un gradiente en orden creciente de disturbio y empobrecimiento de los ensambles determinado por el uso de la tierra (cultivos y sitios destinados a cría de ganado), la composición de los perfiles de agroquímicos y la distancia a sitios sin perturbación por parte de cultivos (Fig. 23).

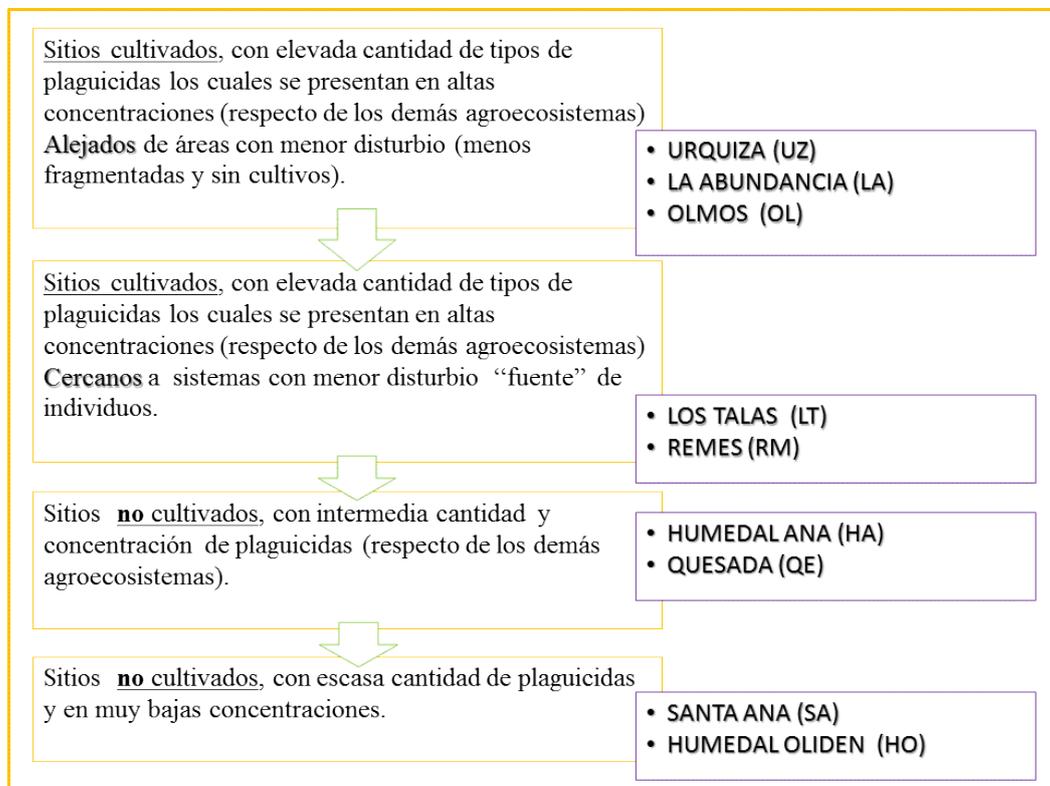


Figura 23: esquema que representa la relación de los ensambles estudiados con las características de los sitios que ocupan.

La ecotoxicología de comunidades ha adoptado algunas de las aproximaciones derivadas de la ecología básica de comunidades para predecir los efectos de estresores químicos [91]. Las medidas de diversidad pueden proveer indicadores del buen funcionamiento de un ecosistema y en el contexto de una investigación ecotoxicológica aportar puntos finales útiles indicadores de efecto de disturbios antrópicos [114]. El presente estudio sugiere que son necesarias estrategias de análisis que incluyan distintas medidas de diversidad para comprender la estructura de los ensambles que se desarrollan en sitios con impacto de plaguicidas. Asimismo resultó necesaria una adecuada caracterización de los factores de estrés operantes en cada agroecosistemas que actúan en adición con los plaguicidas. Un análisis más acabado podrá ser provisto cuando sea conocida la sensibilidad de las especies componentes de estos ensambles, sobre todo de aquellas ausentes en sistemas altamente perturbados.

El estudio de ensambles de anfibios en agroecosistemas tiene relevancia e implicancias en la biología de la conservación, no sólo porque los humedales están en declive [258], sino también debido a las preocupaciones sobre el papel que los plaguicidas pueden estar jugando en las declinaciones globales de anfibios [85]. Algunos autores sugieren que el deterioro de comunidades de anfibios es notable en zonas con actividades agrícolas intensivas y sostenidas en el tiempo [22]. Sin embargo ha sido difícil establecer el rol de los plaguicidas en este proceso, aun teniendo en cuenta la vasta información existente en relación al efecto de los mismos sobre anfibios obtenidos en ensayos de laboratorio.

Los patrones de diversidad de los ensambles estudiados en el presente capítulo son resultado de un proceso histórico y no ha sido estudiada la relación con exposiciones a plaguicidas en este contexto. Por lo tanto, el presente trabajo arroja evidencia concluyente sobre la relación entre la presencia y concentración de

plaguicidas y la estructura de los ensambles de anfibios del noreste de la Región Pampeana sólo si se tienen en cuenta los efectos perniciosos evidenciados a nivel individual y de las poblaciones dentro de un marco de concatenación de efectos.

CAPÍTULO IV

PELIGROSIDAD DE PLAGUICIDAS EN LARVAS DE ANFIBIOS DE LA REGIÓN PAMPEANA

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos cuarenta años, las eco-regiones que integran la baja cuenca del Río de la Plata han estado expuestas a una creciente intervención humana, marcada por un aumento considerable en la proporción de la superficie cultivada [9]. Particularmente la Región Pampeana experimentó los cambios de mayor envergadura, debido a la expansión de la superficie destinada a cultivos anuales. A mediados del siglo XX se sostenía en las praderas pampeanas un uso mixto del suelo asignado a actividades agrícola-ganaderas integradas. La situación cambió a fines del siglo XX y principios del XXI cuando este sistema de uso mixto se sustituye por uno en el cual la agricultura y la ganadería se desacoplaron y especializaron individualmente, dentro un planteo aún más intensivo [259]. La gran modificación de los sistemas naturales suscitó problemáticas ambientales que se reflejan en una importante pérdida de nutrientes y degradación del suelo, aumento en las exportaciones de agua virtual, aparición de nuevas plagas, enfermedades y malezas tolerantes y resistentes y contaminación de los cursos de agua por pesticidas; cuyo impacto sobre la porción biótica de los ecosistemas no ha sido siquiera estimada [260].

Como fue mencionado anteriormente, la Región Pampeana alberga una amplia variedad de cultivos agrícolas entre los que se destacan en cuanto a superficie implantada los cultivos extensivos de soja, maíz girasol, trigo, cebada, avena, centeno, y sorgo. A su vez en los cinturones periurbanos se cultivan en forma intensiva, bajo invernáculo y a campo todas las especies hortícolas destinadas a consumo interno [11]. La mayoría de las prácticas ya sean intensivas o extensivas implican el uso de agroquímicos como factor común que trae aparejados efectos negativos sobre la fauna y flora no blanco de aéreas productivas de la Región Pampeana [57, 77, 78, 94, 99, 141, 261, 262]. Los impactos adversos asociados a la utilización de esta amplia variedad de

agroquímicos sobre grupos particulares de organismos han sido poco estudiados y son escasos los trabajos que integran información proveniente de escenarios de exposición y efectos que pueden ser integrados en el marco de una evaluación de riesgo ecológico [93, 99, 100].

La evaluación de riesgo ecológico fue definida como el proceso de asignación de magnitudes y probabilidades a los efectos adversos relacionados con actividades humanas o catástrofes naturales [263], o como el conjunto de métodos científicos formales destinados a estimar magnitudes y probabilidades de efectos adversos sobre organismos y ecosistemas resultando de eventos en el ambiente que incluyen la liberación de contaminantes, las modificaciones físicas y los desastres naturales [87]. En términos generales, **riesgo** químico es la probabilidad de que ocurra un efecto adverso por exposición a un compuesto tóxico o mezcla [88]. La caracterización más sencilla de un riesgo puede ser realizada en función de cocientes que responden a una comparación de valores únicos de efecto y exposición, basándose en la relación de una concentración de exposición y un punto final de efecto [89]. El valor obtenido es útil como herramienta de aproximación al riesgo aunque *sensu stricto* representa un **peligro**, dado que no está asociado a la probabilidad de ocurrencia. Las limitaciones de su uso se centran en que debe asumirse que las condiciones de exposición y efecto se dan en todo momento y en todo lugar [90]. El análisis de la peligrosidad de un determinado compuesto puede ser enmarcado dentro de las primeras instancias de la evaluación del riesgo ecológico. De esta manera es preciso realizar una adecuada caracterización de la exposición, así como también una adecuada caracterización de los efectos.

El desarrollo y utilización de cocientes de peligrosidad y riesgo, ha tenido un amplio debate en la ecotoxicología actual [89]. Los mismos pueden ser estimados a

través de relaciones de Toxicidad /Exposición (TER: *Toxicity/Exposure Ratios*) y de los cocientes de Peligro (HQ: *Hazard Quotients*).

En los capítulos precedentes fue provista información referente al efecto de los plaguicidas sobre anfibios. Fueron demostrados efectos a nivel individual los cuales tienen implicancias a escala de las poblaciones y los ensambles, sin embargo es de interés realizar un análisis sobre cómo estos escenarios inciden en la anfibiofauna si interesa caracterizar el riesgo del uso de plaguicidas a nivel regional.

Se propone como objetivo del presente capítulo realizar un análisis de la peligrosidad de algunos de los plaguicidas ampliamente utilizados en prácticas agrícolas (cipermetrina, endosulfán, clorpirifós y glifosato) sobre larvas de anfibios de la Región Pampeana.

MATERIALES Y MÉTODOS

La caracterización de la peligrosidad de los insecticidas clorpirifós (CLOR), endosulfán (END) y cipermetrina (CY) y del herbicida glifosato (GLY) fue llevada a cabo mediante el uso del índice QH cuyos valores superiores a uno (1) indican que el tóxico cuenta con peligrosidad de generar efectos adversos [264]. Siguiendo el criterio “del peor caso o escenario”, se utiliza la concentración de efecto de la especie más sensible y la mayor concentración esperada en el ambiente.

En primer lugar fueron calculados los HQ en escenarios de exposición determinados por las concentraciones de plaguicidas detectados en distintos sitios de la Región Pampeana [95, 99, 116, 141, 142, 265]. Los escenarios de exposición aquí propuestos son en general cuerpos de agua lóticos donde la entrada de plaguicidas se da principalmente por escorrentía superficial o por deriva de las aplicaciones. En este caso el perfil de efectos se elaborará utilizando parámetros ecotoxicológicos, específicamente

CL₅₀ (< 96 h) para especies de anfibios anuros provenientes de ensayos de toxicidad aguda en condiciones controladas de laboratorio [32, 33, 44, 45, 47, 49, 57, 64, 73, 83]. Se procedió a la selección de la especie más sensible y en el caso de haber datos disponibles para especies nativas fueron consideradas adicionalmente aun no exhibiendo un mayor valor de sensibilidad.

Fueron calculados además índices de peligrosidad utilizando escenarios de exposición correspondientes a cuerpos de agua lénticos, de tipo temporario y semitemporario, ubicados en aledaños o inmersos en zonas de cultivos extensivos o intensivos. La forma de entrada de los plaguicidas a los sistemas es por aplicación directa. Se utilizarán las concentraciones de los plaguicidas obtenidas en agua total durante el transcurso de este estudio y los porcentajes de efecto sobre la mortalidad de larvas expuestas a esas concentraciones (Capítulo I). En este caso no pudieron ser determinadas las concentraciones de clorpirifós, razón por la cual el índice no fue calculado.

RESULTADOS

Los índices de peligrosidad HQ se detallan en la Tabla 25. Los índices calculados en base a las concentraciones en campo y los porcentajes de efecto obtenidos se muestran en la Tabla 26. En ambos casos el herbicida glifosato no demostró peligrosidad.

Tabla 25: Cocientes de peligro (HQ) calculados en base a concentraciones de plaguicidas en cuerpos de agua de la Región Pampeana y a los valores de CL₅₀

	CL ₅₀ µg/L	Referencia	µg/L	Referencia	HQ
Clorpirifós					
<i>Rana boylei</i>	3,0	Sparling & Fellers (2009)	10,8	Marino & Ronco (2005)	3,6
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	10,2	Agostini <i>et al.</i> (2009)	10,8	Marino & Ronco (2005)	1,1
Endosulfán					
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	0,12	Agostini <i>et al.</i> (2009)	230,5	Capítulo I	1930,2
Cipermetrina					
<i>Dutaphrynus melanostictus</i>	9,0	Saha & Kavirah (2008)	194,0	Marino & Ronco (2005)	21,5
<i>Physalaemus biligonigerus</i>	129,2	Izaguirre <i>et al.</i> (2006)	194,0	Marino & Ronco (2005)	1,5
Glifosato					
<i>Scinax nasicus</i>	1740,0	Lajmanovich <i>et al.</i> (2003)	660	Peruzzo <i>et al.</i> 2008	0,3

Tabla 26: Cocientes de peligro calculados en base a concentraciones de plaguicidas medidas en campo y a los porcentajes de efecto obtenidos

	% de efecto 24 h	Referencia	µg/L	Referencia	HQ
Endosulfán					
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	96,9	Capítulo I	230,5	Capítulo I	2,4
Cipermetrina					
<i>Leptodactylus latrans</i>	25,2	Capítulo I	365,2	Capítulo I	14,5
Glifosato					
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	1	Capítulo I	231,8	Capítulo I	231,8

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Como hemos mencionado en los capítulos precedentes existe una amplia bibliografía referente al efecto de los plaguicidas sobre anfibios basada principalmente en estudios de laboratorio [27, 83]. Sin embargo al realizar la búsqueda de información complementaria a la generada en este trabajo de tesis doctoral, llama la atención los escasos datos existentes de CL_{50} (72 o 96 h) de los plaguicidas clorpirifós, endosulfán, cipermetrina y glifosato. Esta información se ve parcializada si se acota la búsqueda a formulaciones comerciales o a principios activos, y aún más pronunciada si interesa obtener estos datos para especies nativas.

La escasez de información también se refleja en los pocos trabajos existentes sobre datos de concentraciones ambientales de los plaguicidas ampliamente usados en la región. Aún es más escasa la información si se tienen en cuenta las concentraciones de plaguicidas obtenidas en agua y sedimento en sistemas lénticos. Unos pocos trabajos han dado a conocer concentraciones en este tipo de cuerpos de agua [19, 47, 99, 100].

Los resultados sobre los índices de peligrosidad HQ expresan similares tendencias a las obtenidas en ensayos de laboratorio y campo con larvas de anfibios referentes a la toxicidad relativa de los compuestos en cuestión si se tienen en cuenta especies nativas. Tomando en consideración que un valor superior a uno (1) determina la existencia de peligrosidad, se muestra que la misma resulta elevada en el caso de los insecticidas clorpirifós, endosulfán y cipermetrina mientras que el glifosato no resultó peligroso para larvas de anfibios anuros considerando efectos agudos letales en ninguno de los escenarios.

Los antecedentes indican una notable peligrosidad de los plaguicidas para los insecticidas clorpirifós, endosulfán y cipermetrina de acuerdo a los resultados obtenidos en estudios realizados con otro tipo de organismos [100 - 102]. El glifosato exhibe baja

peligrosidad aguda (efectos letales) para las especies de anfibios consideradas, sin embargo pudo ser demostrado a través del presente estudio que aplicaciones en condiciones naturales generaron efectos subletales en larvas de anfibios nativos (Capítulo I).

El clorpirifós es considerado moderadamente tóxico para anfibios, fitoplancton y zooplancton; altamente tóxico para peces y muy altamente tóxico para anélidos y crustáceos [42, 44]. Por su parte, el endosulfán es considerado moderadamente tóxico para anfibios, anélidos y fitoplancton; altamente tóxico para crustáceos y zooplancton y muy altamente tóxico para peces [44, 51]. La cipermetrina no tiene un acuerdo sobre la asignación a una categoría de toxicidad para anfibios dado que los rangos de concentraciones de efecto son muy amplios, pero es considerada altamente tóxica y muy altamente tóxica para anélidos, crustáceos y zooplancton [44, 49]. Finalmente, el glifosato es considerado levemente tóxico para anfibios, peces y zooplancton y moderadamente tóxico para crustáceos y anélidos [44, 266]. En vistas de estas categorías de toxicidad [267] proporcionadas por valores de LC_{50} obtenidas en ensayos de laboratorio [44] es posible establecer que la peligrosidad de los plaguicidas evaluados no sólo está dada sobre las comunidades de anfibios anuros sino que además alerta sobre el riesgo que corren gran parte de los componentes bióticos de los ecosistemas acuáticos pampeanos.

Los efectos adversos de la exposición a una sustancia tóxica, como los plaguicidas, dependen de cada compuesto en particular, como así también de la concentración y ruta de exposición, y del tiempo y frecuencia de este contacto [23]. Los efectos adversos dependen también de las características anatómicas, fisiológicas y de la historia natural de los individuos expuestos; es decir, que el riesgo también está determinado en función de la vulnerabilidad de la población. Es importante considerar

que si bien se están evaluando pulsos de contaminación por parte de cuatro plaguicidas, los resultados obtenidos en los Capítulos I y III de esta tesis, indican que las larvas de anfibios están expuestas a concentraciones subletales de una amplia variedad de agroquímicos. Asimismo la detección de insecticidas en sedimentos no asociados a aplicaciones previas sugiere la posibilidad de que las exposiciones ocurran de manera crónica.

El conjunto de resultados alerta sobre la necesidad de contar con estudios más detallados para estimar el riesgo de la anfibiofauna asociada a agroecosistemas de La Región Pampeana. Se hace patente la necesidad de generar información proveniente de efectos letales y subletales de los plaguicidas sobre especies nativas en condiciones de campo y laboratorio. Complementariamente es necesario realizar estudios sobre concentraciones de plaguicidas en agua y sedimento de cuerpos lóticos. De esta manera podrá generarse la información adecuada necesaria para implementar medidas de protección en estrategias de manejo y control de sistemas productivos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Durante las últimas tres décadas se generó un gran caudal de información referente a los efectos de plaguicidas sobre anfibios, cuyo motor impulsor fue la hipótesis de que el uso de plaguicidas asociados a prácticas agrícolas es uno de los factores causantes del fenómeno de declinación mundial [38]. La ecotoxicología de plaguicidas en anfibios se basó principalmente en datos provenientes de investigaciones realizadas con bioensayos de toxicidad de laboratorio, mientras que muy pocos estudios se desarrollaron en condiciones naturales [33]. Los estudios de laboratorio demostraron, además de efectos letales, efectos neurotóxicos que repercuten sobre los movimientos de natación [48, 56, 64, 104, 109, 268]. Adicionalmente la inhibición en el crecimiento representa un efecto frecuentemente mencionado en la literatura [50, 57, 64, 69, 269]. En este trabajo de tesis fue posible demostrar que la exposición en condiciones naturales induce similares tipos de efectos que los mencionados en la literatura. La reducción de los movimientos natatorios y la inhibición del crecimiento fueron efectos bien representados cuando se estudiaron condiciones de exposición en escenarios reales. Además, se concluye que el nivel de los efectos observados en los ensayos a campo es concordante con los resultados obtenidos en laboratorio [33], evidenciándose el siguiente orden de toxicidad relativa: endosulfan > clorpirifós > cipermetrina >> glifosato.

La gran mayoría de los estudios conducidos en laboratorio fueron realizados bajo exposición a plaguicidas en forma de compuestos activos y poca información está disponible sobre el efecto de la enorme variedad de formulaciones comerciales [33, 44]. También se destaca que la mayoría de los efectos sobre anfibios asociados a plaguicidas fueron estudiados a partir de ensayos de laboratorio que probaron la toxicidad de un sólo compuesto [19, 33, 44]. Ha sido mencionado que los efectos de las mezclas de aplicación y la amplia variedad de excipientes de las formulaciones comerciales resultan poco predecibles y de allí la necesidad de estudiar efectos en escenarios reales de

exposición [100, 105, 158, 270]. Los resultados del presente trabajo de tesis fueron obtenidos a partir de evaluaciones en escenarios de campo que incluyen la aplicación de plaguicidas en formulaciones comerciales y en mezclas de los mismos, y por tanto pueden esperarse diferencias en los valores de toxicidad de los compuestos respecto de aquellas obtenidas en laboratorio sobre todo en el caso del glifosato.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, junto a los resultados de esta tesis, se concluye que las evaluaciones en escenarios reales de exposición resultan necesarias y permiten complementar los perfiles de evaluación de riesgo de plaguicidas basados en estudios desarrollados en laboratorio. Ambos enfoques de la ecotoxicología pueden ser empleados como estrategias integradas para valorar los efectos adversos de los plaguicidas sobre anfibios nativos.

Las exposiciones en condiciones ambientales y los distintos factores de estrés que operan en los agroecosistemas a través de escalas múltiples, están comúnmente interconectados y contribuyen a complejizar los contextos en los cuales se evalúan los impactos [19, 27, 271]. Los diversos escenarios de exposición que actúan en los distintos estadios de vida de los anfibios deben ser detalladamente analizados y discutidos para poder comprender los efectos perjudiciales inducidos por los agroquímicos, que según algunos autores han sido hasta el momento subestimados [27, 75].

Reveladores estudios han demostrado que los plaguicidas pueden causar beneficio a las larvas de anfibios, distendiendo las relaciones de competición e incrementando la fuente de alimento disponible [137, 272, 273] o eliminando a los predadores [274]. Aunque estas variables no han sido estudiadas en el presente estudio, los resultados obtenidos a partir de las evaluaciones en campo advierten que las aplicaciones de plaguicidas están generando efectos perniciosos en estadios larvales de

Hypsiboas pulchellus, *Rhinella fernandezae* y *Leptodactylus latrans*, tres especies representativas de la región [12]. Estos efectos se vieron evidenciados no sólo en la reducción de la supervivencia de larvas expuestas, sino también en el conjunto de puntos finales subletales puestos a prueba en el presente estudio.

Frecuentemente los cambios en el comportamiento (entre ellos los movimientos de natación) representan los primeros signos de exposición a un determinado estrés químico [27], lo cual hace de este punto final un muy sensible indicador de exposición. Sin embargo dependiendo de la capacidad de detoxificación del compuesto y de la recuperación, este punto final puede carecer de relevancia ecológica [23, 275]. Los resultados obtenidos en relación al efecto de los plaguicidas sobre el movimiento larval no evidenciaron recuperación, sino agravamiento luego de 24 y 48 h de exposición. Asimismo, debe ser considerado que la incapacidad de movimiento puede, en el caso de los estadios larvales, aumentar la probabilidad de predación y disminuir el tiempo dedicado a la búsqueda de alimento [156, 276] conduciendo finalmente a la muerte de los individuos. El agravamiento de los efectos en la natación determinando la ulterior muerte fue demostrado para otras especies de anfibios y está vinculado a la persistencia de la toxicidad [277]. También fue comprobado que efectos letales pueden evidenciarse de manera tardía respecto de la exposición al tóxico y son conocidos como efectos retrasados (*lag effect*) [54]. No fue estudiado en el presente trabajo el agravamiento de los efectos a nivel individual de cada larva, aunque la ausencia de recuperación registrada a las 48 h de ocurridas las aplicaciones alerta sobre este posible efecto. Una evaluación sobre la persistencia de la toxicidad de los plaguicidas implicados podría arrojar evidencias sobre la ocurrencia y significancia del este fenómeno.

El caso de las exposiciones de glifosato merece ser discutido de manera particular. Redefinido por numerosos autores como un herbicida de corta persistencia en

el ambiente y baja toxicidad sistémica para humanos, vertebrados en general e insectos [68, 278], ha sido señalado como un agroquímico seguro y de bajo riesgo para los sistemas y entornos agrícolas en los cuales es utilizado [266]. Alternativamente, fue demostrado que el compuesto activo y la amplia variedad de formulaciones comerciales de este herbicida pueden ser tóxicas para anfibios, otros vertebrados e insectos [37, 69, 136, 279, 280]. Esta creciente evidencia apoyada fundamentalmente en estudios de laboratorio, alerta sobre la peligrosidad de este herbicida. Pocos estudios con anfibios fueron conducidos en escenarios reales de exposición, los cuales no arrojaron resultados concluyentes. Por un lado sugieren que el glifosato en formulaciones comerciales no es tóxico a concentraciones ambientalmente relevantes y su toxicidad es altamente dependiente del sitio en que ocurren las aplicaciones, así como también de la especie expuesta [108, 281]. En el otro extremo se hallan los estudios que identifican al glifosato en su amplia variedad de formulaciones comerciales, como un compuesto tóxico para larvas de anfibios [19, 111]. Los resultados del presente trabajo indican que las aplicaciones de formulaciones de este herbicida mostraron toxicidad y la disminución en el movimiento de larvas expuestas aporta evidencia concluyente. Inclusive, se detectaron descensos en la abundancia de larvas luego de transcurridos cinco días de las aplicaciones, con información fidedigna de ausencia de otras aplicaciones en la zona inmediata a las charcas. Podría esperarse que los efectos subletales observados en relación a las aplicaciones de glifosato conduzcan eventualmente a la muerte de los organismos, lo cual ha sido demostrado para varias especies de ranas leopardo [139]. En vistas de la información existente y atendiendo a los resultados alcanzados en este estudio se destaca que la evaluación de la toxicidad y la consecuente peligrosidad de una sustancia deben estar basadas en una adecuada selección de puntos finales con significancia ecológica.

La expansión e intensificación de las prácticas agrícolas constituye uno de los cambios ambientales predominantes en tiempos contemporáneos [282]. Las prácticas relacionadas a la agricultura pueden afectar a los ecosistemas de distintas maneras. El reemplazo de paisajes naturales por unas pocas especies vegetales que conforman monocultivos ha generado importantes impactos relacionados a la modificación y fragmentación del hábitat [283], sin embargo los efectos producidos por la utilización de agroquímicos conexos a estas prácticas sobre anfibios nativos ha sido un tema controversial [85, 176]. En este trabajo de tesis fue comprobado un descenso en la supervivencia larval de tres especies de anfibios luego de las distintas aplicaciones mediante la utilización de limnocorrales, lo cual constituye la prueba que establece la relación univoca causa-efecto para cuatro de los plaguicidas más comúnmente usados en la región. Adicionalmente pudo corroborarse que los descensos en la supervivencia de larvas confinadas en los limnocorrales se ven reflejados en los descensos de la abundancia a nivel de las charcas. A partir de este escenario fue posible aplicar la propuesta de Newman & Clements [91] en la cual la ecotoxicología se desarrolla dentro del paradigma de una ciencia jerárquica y los efectos entre los distintos niveles de organización pueden extrapolarse entre sí.

Como ha sido indicado oportunamente, la mortalidad, la inhibición del crecimiento, el tiempo a la metamorfosis y las altas prevalencias de malformaciones en larvas que cumplen sus ciclos en charcas pertenecientes a sistemas cultivados puede estar en estrecha relación con la exposición a plaguicidas, ya sea por acción directa o indirecta. Los efectos indirectos pueden tener su origen en los cambios que los plaguicidas determinan sobre los parámetros fisicoquímicos de las charcas [56, 160], sobre las comunidades algales fuente de alimento para las larvas [139] o sobre las relaciones intra/ interespecíficas [76]. No han sido realizados en este trabajo de tesis

estudios relacionados con los efectos de plaguicidas sobre la comunidad algal ni cómo estos afectan a las relaciones intra/ interespecíficas, aunque ha podido ser demostrado que los valores de los parámetros fisicoquímicos de las charcas (pH, conductividad, OD y temperatura) no cambian pasadas las 24 y 48 h de las aplicaciones por lo que no están asociados a las mortalidades observadas. Los dos efectos indirectos restantes tienen un tiempo de acción prolongado antes de que sean observados [79, 156] por lo cual tampoco estarían explicando las mortalidades obtenidas a 24 y 48 h de exposición. Estos efectos indirectos podrían estar actuando generando inhibición del crecimiento y menores tiempos a la metamorfosis, los cuales fueron detectados en larvas de sitios cultivados. Sea cual fuera el o los factores operantes (directos o indirectos), el hecho de que los renacuajos de charcas expuestas experimenten una metamorfosis temprana antes de alcanzar el tamaño umbral para ésta, resulta en individuos terrestres con tamaños corporales reducidos y una consecuente baja eficiencia biológica [284]. De esta forma la población puede verse afectada negativamente con la presencia de adultos comprometidos en su desempeño y a largo plazo podrían evidenciarse extinciones locales asociadas a una baja viabilidad poblacional [104]. Los bajos valores de los índices de condición corporal correspondientes a la clase etaria de juveniles habitantes de sistemas cultivados se prolongan a las edades adultas en concordancia con lo demostrado para otras especies de anfibios [284].

Es probable que un sistema alterado (como lo es un monocultivo) pueda soportar capacidades de carga inferiores a las de un sitio menos perturbado [285], es decir, que puede mantener una menor cantidad de individuos. Aunque en las bajas abundancias de larvas que logran completar la metamorfosis podría subyacer la causa primaria de las bajas densidades de adultos detectadas en las tres poblaciones pertenecientes al sitio cultivado.

Los estudios sobre poblaciones de *H. pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans* se llevaron a cabo en dos agroecosistemas con distinto grado de disturbio. Si bien ambos sitios son representativos y en ellos se llevan a cabo actividades productivas típicas de la región, podría esperarse que las diferencias obtenidas a nivel de los parámetros poblacionales se deban a algún factor de tipo histórico no ponderado en este estudio, o simplemente a efectos del azar. Para despejar estas incertidumbres fue realizado un estudio a mayor escala espacial que involucra a nueve ensambles de anfibios habitantes de agroecosistemas con distinto grado de modificación por parte de actividades agrícolas. Las diferencias en las abundancias de *H. pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans* resultado de los estudios realizados en los dos sitios mencionados se vieron reflejadas cuando se evaluaron los ensambles de nueve agroecosistemas, es decir, que estas tres especies son menos abundantes en aquellos sitios sometidos a una intensa actividad agrícola y con presencia de una elevada cantidad de plaguicidas.

Además de poder establecer las relaciones entre los niveles de organización mencionados, interesó realizar un estudio sobre los ensambles dado el gran consenso existente sobre el hecho de que las medidas de diversidad (o puntos finales en el marco de la ecotoxicología de comunidades) pueden ser usadas como indicadoras del buen funcionamiento de un ecosistema [226]. Frecuentemente los valores de riqueza (número de especies) son utilizados para advertir cambios en los ecosistemas generados por actividades antrópicas [91, 229]. Los resultados de este trabajo de tesis no permitieron identificar diferencias en la riqueza de especies entre los distintos ensambles por lo cual resultó necesario implementar análisis de abundancias de especies. Los mismos indicaron que las relaciones de abundancia en sistemas cultivados se ven distorsionadas en relación a aquellas pertenecientes a ensambles de sitios sin cultivos. No sólo *H. pulchellus*, *R. fernandezae* y *L. latrans*, sino que la mayoría de las especies presentan

abundancias menores en sitios cultivados y con mayor número de plaguicidas detectados, mientras que dos de ellas (*Leptodactylus latrans* y *Rhinella arenarum*) parecen poder explotar los recursos que proporcionan los agroecosistemas cultivados.

Tomando en consideración las características fisicoquímicas y espaciales y la presencia y concentración de los plaguicidas analizados en aguas y sedimentos, pudo demostrarse que las mayores abundancias de anfibios se registran en aquellos agroecosistemas menos contaminados, con un mayor número de especies de macrófitas y una menor distancia a sitios con escaso disturbio. El conjunto de estos factores y los resultados arrojados son coincidentes con otros estudios que demuestran la existencia de diversos factores de estrés en adición al tipo y concentración de plaguicidas presentes en el ambiente que operan sobre los patrones de diversidad [19, 256].

Los ensambles pertenecientes a sitios cultivados se encuentran ubicados en un mosaico de explotaciones agrícola-ganaderas [92]. De esta manera los cultivos que tienen cierta cercanía con sitios menos disturbados contienen ensambles con mayor cantidad de especies y mayor abundancia de las mismas. Estos sitios, que resultaron ser en su totalidad pasturas para cría de ganado, relacionados básicamente con áreas inundables, podrían proveer de individuos que migren y colonicen las charcas de los cultivos, oficiando de áreas *fuentes* [257, 279]. Es ampliamente conocido que las poblaciones de anfibios fluctúan y la dinámica de las metapoblaciones puede dar lugar a extinciones locales y colonizaciones que son difíciles de documentar y predecir [179]. Pero aun asumiendo el más alentador escenario donde las especies recolonizan las aéreas impactadas, las reiteradas aplicaciones de plaguicidas junto a los volúmenes utilizados, apoyarían con mayor peso la posibilidad de ocurrencia de extinciones locales. Esto ocurriría sobre todo en sitios con alto grado de fragmentación [179] que se

encuentran aislados de sitios menos disturbados y con mayor probabilidad en el caso de las especies más sensibles de los ensamblajes.

Finalmente puede concluirse que si bien distintos factores de estrés están contribuyendo a la generación de los efectos evidenciados en este estudio a través de los distintos niveles de organización biológica, las detecciones de agroquímicos en muestras ambientales prueban que la exposición a los mismos es un factor clave. La aplicación del razonamiento inductivo y el paradigma de la ecotoxicología como una ciencia jerárquica resultó una excelente herramienta de análisis conceptual, permitiendo establecer que aquellos efectos de los plaguicidas evidenciados a nivel individual determinan la estructura de las poblaciones y de los ensamblajes de anfibios a nivel regional en el noroeste de la Región Pampeana argentina. Futuras investigaciones que identifiquen el efecto de múltiples factores de estrés son necesarias para determinar el grado en que los plaguicidas contribuyen a estos efectos.

Estudios conducidos en agroecosistemas de la Región Pampeana han demostrado que en ambientes lóticos la escorrentía proporciona una mayor vía de entrada a los sistemas acuáticos superficiales que la deriva [77, 100]. Las concentraciones obtenidas en sedimentos estuvieron en el orden de los 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el caso de la cipermetrina y el clorpirifós, mientras que el endosulfán fue más frecuente y en algunos casos superó los 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A lo largo del trabajo de campo fue presenciada en varias oportunidades la aplicación directa y sin interrupción sobre estos cuerpos de agua, los cuales son de tipo léntico y presentan áreas y profundidades menores en comparación con los sistemas lóticos. Es probable que las altas concentraciones detectadas en el presente trabajo estén asociadas a las aplicaciones directas de los plaguicidas (por aspersión) que constituyen la mayor fuente de impacto sobre los cuerpos de agua estudiados.

En el presente estudio se demostró la existencia de una importante variedad de plaguicidas detectados en agua y sedimento los cuales no se asocian a la práctica de control químico inmediata. Además, algunos estudios comprobaron la alta persistencia de toxicidad de los plaguicidas comúnmente usados en la región sobre fauna nativa, pudiendo esta persistencia variar de acuerdo al plaguicida aplicado y al organismo en que se evalúa el efecto [99, 100]. Los ciclos larvales de las especies de anfibios tienen una duración máxima de 70 días en temporada estival [12]. Teniendo en cuenta la variedad de plaguicidas, sus concentraciones y la persistencia de la toxicidad de alguno de ellos es posible determinar que las exposiciones a los plaguicidas de anfibios de la Región Pampeana (fundamentalmente en su fase de vida acuática) están ocurriendo a nivel crónico, además de los pulsos agudos que han venido siendo estudiados [Capítulo I, 57, 77].

A partir de los cocientes de peligrosidad calculados fue posible establecer que los insecticidas representan una fuente de riesgo para las especies de anfibios. Estos resultados y los obtenidos en diferentes niveles de organización biológica reúnen una importante evidencia sobre la peligrosidad y los efectos inducidos por las prácticas agrícolas extensivas e intensivas y sostenidas en el tiempo sobre anfibios nativos de la región.

El desarrollo de actividades agrícolas es identificado como una de las mayores causas que contribuyen a la pérdida de biodiversidad, no sólo por la reducción y fragmentación del hábitat consecuencia de las inmensas extensiones de tierra que ocupan, sino por el efecto de los agroquímicos empleados. Los modelos productivos existentes a nivel mundial seguirán dependiendo de la utilización de una variada cantidad de plaguicidas por lo cual el presente estudio puede contribuir al desarrollo de

adecuados métodos de análisis y predicción de efectos asociados a los plaguicidas y su implicancia en medidas de gestión y protección de anfibios autóctonos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Devine GJ, Furlong MJ (2007) Insecticide use: contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values* 24: 281-306.
- [2] FAO Food and Agricultural Organization of the United Nations (2002) *Agricultura Mundial: Hacia los Años 2015/2030. Informe resumido*. <http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s08.htm>. [Acceso Abril 2012].
- [3] Bindraban PS, Franke AC, Ferraro DO, Ghersa CM, Lotz LAP, Nepomuceno A, Smulders MJM, van de Wiel CCM (2009) *GM-Related Sustainability: Agro-ecological Impacts, Risks and Opportunities of Soy Production in Argentina and Brazil*. Plant Research International B.V., Wageningen, Países Bajos, pp 11-12.
- [4] Ambrosetti E, Landgraf F, Pascuzzi N (2009) Evolución del perfil del productor agropecuario y las empresas rurales en el período 1949-2009. En: Ricci D (Coord.) Argentina 2050. *La Revolución Tecnológica del Agro*. CASAFE, Buenos Aires, Argentina pp 120-150.
- [5] Grau HR, Aidec TM, Gasparrid NI (2005) Globalization and soybean expansion into semiarid ecosystems of Argentina. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 34(3): 265-266.
- [6] Barsky M (2009) La agricultura de “cercanías” a la ciudad y los ciclos del territorio periurbano. Reflexiones sobre el caso de la Región Metropolitana de Buenos Aires. En: Svetlitz de Nemirovsky A (Coord.) *Globalización y Agricultura Periurbana en la Argentina: Escenarios, Recorridos y Problemas*. Serie Monografías FLASCO, Buenos Aires, Argentina pp 15-30.
- [7] Pengue W (2000) *Cultivos Transgénicos ¿Hacia Dónde Vamos?* Lugar Editorial SA, Buenos Aires, Argentina.
- [8] CASAFE Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (2009) <http://www.casafe.org>. [Acceso Diciembre 2012].
- [9] Viglizzo EF, Franck C, Carreño L (2006) Ecorregiones Pampa y Campos y Malezales. En: Brown A, Martínez Ortiz U, Acerbi M, Corcuera J (eds.) *La Situación Ambiental Argentina 2005*. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, pp 271-278.
- [10] Marano M, Stevani R, Gramundo A, Bisciotii I, Samartino S (2004) *Proyecto de Fortalecimiento Institucional para el Desarrollo Rural de la Provincia de Buenos Aires*. PROINDER, Buenos Aires, Argentina.
- [11] Cappello V, Fortunato N (2008) *Plaguicidas en la Provincia de Buenos Aires: Información Toxicológica, Ecotoxicológica y Aspectos Ambientales*. OPDS, Buenos Aires, Argentina.
- [12] Cei JM (1980) Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano, Italian Journal Zoology*, Monogr 2: 1-609.
- [13] Frost DR (2013) *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.6. Electronic Database American Museum of Natural History, New York, USA. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. [Acceso Marzo 2012].
- [14] Ouellet M, Bonin J, Rodrigue J, DesGranges JL, Lair S (1997) Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of Wildlife Diseases* 33(1): 95-104.
- [15] Harris ML, Bishop CA, Struger J, van den Heuvel MR, Van Der Kraak GJ, Dixon DG, Ripley B, Bogart JP. 1998. The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) populations in orchard wetlands. I. Genetics, physiology, and biochemistry of breeding adults and young-of-the-year. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 1338-1350.

- [16] Johnson PTJ, Lunde KB, Thurman EM, Ritchie EG, Wray SN, Sutherland DR, Kapfer JM, Terrence JF, Bowerman J, Blaustein AR (2002) Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs* 72: 151-168.
- [17] Attademo A, Peltzer P, Lajmanovich R (2005) Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 106: 389-394.
- [18] Agostini MG, Kacolis, F, Demetrio P, Natale G, Bonetto C, Ronco AE (2013) Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems from Northeastern of Buenos Aires province, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* DOI: 10.3354/dao02592.
- [19] Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP (2009) Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157: 2903-2927.
- [20] Knutson MG, Richardson WB, Reineke DM, Gray BR, Parmelee JR, Weick SE (2004) Agricultural ponds support amphibian populations. *Ecological Applications* 14: 669-684.
- [21] Davidson C (2004) Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecological Applications* 14: 1892-1902.
- [22] Bishop CA, Mahony NA, Struger J, Ng P, Pettit KE (1999) Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River watershed, Ontario, Canada. *Environmental Monitoring and Assessment* 57: 21-43.
- [23] Rozman KK, Doull J, Hayes Jr WJ (2010) Dose and time determining, and other factors influencing, toxicity. En: Krieger R (ed.) *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, USA pp 3-110.
- [24] Hanson L, Ritter L (2010) Toxicity and safety evaluation of pesticides. En: Krieger R (ed.) *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, USA pp 333-336.
- [25] Newman MC, Unger MA (2003) *Fundamentals of Ecotoxicology*, 2nd edn. CRC/Lewis Publishers, Boca Raton, USA pp 3-20
- [26] Semlitsch RD, Bridges CM (2005) Amphibian ecotoxicology. En: Lannoo M (ed.) *Amphibian Declines. The Conservation Status of United States Species*. University of California Press, Los Angeles, USA pp 241-243.
- [27] Linder G, Lehman CM, Bidwell JR (2010) Ecotoxicology of amphibians and reptiles in a nutshell. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA (eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, 2nd edn. SETAC Press, California, USA pp 69-103.
- [28] USEPA US Environmental Protection Agency (2000) *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of Sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*, 2nd edn. EPA 600/R-99/064, Washington DC, USA.
- [29] IRAM 29012-16 Instituto Argentino de Normalización (2003) *Calidad Ambiental – Calidad del Agua. Muestreo Parte 16: Guía para el bioensayo de muestras*. Buenos Aires, Argentina.
- [30] Castillo Morales G (ed.) (2004) *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, México DF, México.
- [31] Ramírez Romero P, Mendoza Cantú A (2008) *Ensayos Toxicológicos para la Evaluación de Sustancias Químicas en Agua y Suelo. La Experiencia en México*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México DF, México.
- [32] Pauli BB, Perrault JA, Money SL (2000) *RATL: A Database of Reptile and Amphibian Toxicology Literature. Technical Report Series 357*. Canadian Wildlife Service, Quebec, Canada.
- [33] Lehman CM, Williams BK (2010) Effects of current-use pesticides on amphibians. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA (eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, 2nd edn. SETAC Press, California, USA pp 167-202.

- [34] Akkermans LMA, van den Bercken J, Versluijs-Helder M (1975) Excitatory and depressant effects of dieldrin and aldrintransdiol on the spinal cord of the toad (*Xenopus laevis*). *European Journal of Pharmacology* 34: 133-142.
- [35] Salibián A, Marazzo L (1995) Studies on the effects of deltamethrin on sodium net transport through the in vivo amphibian skin. *Biomedical and Environmental Science* 8: 165-168.
- [36] Smith TJ, Soderlund DM (1998) Action of the pyrethroid insecticide cypermethrin on rat brain IIa sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurotoxicology* 19(6): 823-832.
- [37] Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, López SL, Carrasco AE (2010) Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Resources Toxicology* 23: 1586-1595.
- [38] Alford RA (2010) Declines and the global status of amphibians. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA (eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, 2nd edn. SETAC Press, California, USA pp 13-45.
- [39] Cowman DF, Mazanti LE (2000) Ecotoxicology of “new generation” pesticides to amphibians. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA (eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Press, Pensacola, USA pp: 233-268.
- [40] Kleffman & Partener SRL (2010) *Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios*. Kleffmanngroup Argentina. <http://casafe.org.ar/estad/Mercado2010.htm>. [Acceso Julio 2012].
- [41] Eastmond DA, Balakrishnan S (2010) Genotoxicity of pesticides. En: Krieger R (ed.) *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, USA pp 357-380.
- [42] USEPA US Environmental Protection Agency (2002) *Interim reregistration eligibility decision for chlorpyrifos*. EPA 738-R-01-007. Case N° (0100). USEPA, Washington DC, USA.
- [43] ANMAT Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (2008) *Disposición 2659/2008*. http://www.anmat.gov.ar/retiros/mayo/Disposicion_ANMAT_2659-2008.pdf. [Acceso Diciembre 2012].
- [44] Kegley SE, Hill BR, Orme S, Choi AH (2011) *PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America* © 2000-2010. <http://www.pesticideinfo.org>. [Acceso Enero 2013].
- [45] Agostini MG, Natale GS, Ronco AE (2005) Efectos letales y subletales del insecticida clorpirifós sobre larvas de *Hyla pulchella* (Anura: Hylidae). Congreso Latinoamericano SETAC. Santiago de Chile (Chile).
- [46] Sparling D, Fellers G (2009) Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology* 28(8): 1696-1703.
- [47] Ruiz de Arcaute C, Salgado Costa C, Demetrio PM, Natale GS, Ronco AE (2012) Influence of existing site contamination on sensitivity of *Rhinella fernandae* (Anura, Bufonidae) tadpoles to Lorsban®48E formulation of chlorpyrifos. *Ecotoxicology* DOI 10.1007/s10646-012-0990-4.
- [48] Widder PD, Bidwell JR (2008) Tadpole size, cholinesterase activity and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology* 88: 9-18.
- [49] Bernabò I, Sperone E, Tripepi S, Brunelli E (2011) Toxicity of chlorpyrifos to larval *Rana dalmatina*: acute and chronic effects on survival, development, growth and gill apparatus. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 704-718.
- [50] Richards SM, Kendall RJ (2003) Physical effects of chlorpyrifos on two stages of *Xenopus laevis*. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 66(1): 75-91.
- [51] USEPA US Environmental Protection Agency (2010) *EPA Action to Terminate Endosulfan*. <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/endosulfan/endosulfan-cancel-fs.html#decision>. [Acceso Noviembre 2012].

- [52] Silva M, Beauvais S (2010) Risk assessment for acute, subchronic, and chronic exposure to pesticides: Endosulfan. En: Krieger R (ed.) *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, USA pp 499-550.
- [53] Bernabò I, Brunelli E, Berg C, Bonacci A, Tripepi S (2008). Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization. *Aquatic Toxicology* 86(3): 447-456.
- [54] Jones DK, Hammond JI, Relyea RA (2009) Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9): 1939-1945.
- [55] Lavorato M, Bernabò I, Crescente A, Denoël M, Tripepi S, Brunelli E. (2013). Endosulfan effects on *Rana dalmatina* tadpoles: quantitative developmental and behavioural analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64(2): 253-262.
- [56] Brunelli E, Bernabò I, Berg C, Lundstedt-enkel K, Bonacci A, Tripepi S (2009) Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 91: 135-142.
- [57] Agostini MG, Natale G, Ronco AE (2009) Impact of endosulphan and cypermethrin mixture on amphibians under field use for biotech soya bean production. *International Journal of Environmental and Health* 3(4): 279-289.
- [58] Lajmanovich RC, Cabagna M, Petzler PM, Stringhini G, Attademo AM (2005) Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed insecticides endosulfan. *Mutation Research* 587: 67-72.
- [59] USEPA US Environmental Protection Agency (1989) *Pesticide Fact Sheet 199: Cypermethrin*. US EPA, Office of Pesticide Programs, Registration Division, Washington DC, USA.
- [60] Soderlund DM (2010) Toxicology and mode of action of pyrethroid insecticides. En: Krieger R (ed.) *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, USA pp 1665-1683.
- [61] Kaneko H (2010) Pyrethroid chemistry and metabolism. En: Krieger R (ed.) *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, USA pp 1635-1663.
- [62] Paulov S (1990) Potential impact of pyrethroids (cypermethrin) on the model amphibians (*Rana temporaria*). *Biologia (Bratislava)* 45: 133-139.
- [63] Saha S, Kaviraj A (2008) Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80: 49-52.
- [64] Agostini MG, Natale GS, Ronco AE (2010) Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology* 19: 1540-1550.
- [65] Izaguirre MF, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Soler AP, Casco VH (2000) Cypermethrin-induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65: 501-507.
- [66] Casco V, Izaguirre MF, Marin L, Vergara N, Lajmanovich R, Petzler P; Peralta Soler A (2006) Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin. *Cellular Biology and Toxicology* 22: 199-211.
- [67] Cabagna M, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Attademo M, Ale E (2006) Induction of micronucleus in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Toxicology and Environmental Chemistry* 88: 729-737.
- [68] Giesy JP, Dobson S, Solomon KR (2000) Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Review of Contamination and Toxicology* 167: 35-120.

- [69] Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoen N (2004) Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(8): 1928-1938.
- [70] Relyea RA, Jones DK (2009) The toxicity of Roundup Original Max to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9): 2004-2008.
- [71] Lajmanovich C, Lorenzatti E, Maitre MI, Enrique S, Peltzer PM (2003) Comparative acute toxicity of the commercial herbicides Glyphosate to neotropical tadpoles *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae). *Fresenius Environmental Bulletin* 12(4): 364-367.
- [72] Lajmanovich RC, Sandobal MT, Petzler PM (2003) Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed by glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology* 70: 612-618.
- [73] Paracampo AH, Agostini MG, Natale GS, Ronco A (2008) Efecto letal agudo del herbicida Roundup® sobre larvas de *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). V Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos. Lujan (Argentina).
- [74] Boone MD, James SM (2005). Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology* 2(3): 231-257.
- [75] Brühl CA, Schmidt T, Pieper S, Alscher A (2013) Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? *Scientific Reports* 3: 1135 DOI: 10.1038/srep01135.
- [76] Boone MD, Davidson C, Briton CM (2009) Evaluating the impact of pesticides in amphibian decline. En: Heatwole H, Williamson J (eds.) *Amphibian Decline: Diseases, Parasites, Maladies and Pollution*. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, Inglaterra pp 3183-3207.
- [77] Ronco A, Carriquiriborde P, Natale GS, Martin ML, Mugni H, Bonetto C (2008) Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pampasic Region. En: Chen J, Guô C (eds.) *Ecosystem Ecology Research Trends*. Nova Publishers, New York, USA pp 209-239.
- [78] Brodeur JC, Suarez RP, Natale GS, Ronco AE, Zaccagnini ME (2011) Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(5): 1370-1380.
- [79] Jofré MB, Antón RI, Caviedes-Vidal E (2008) Organochlorine contamination in Anuran Amphibians of an artificial lake in the semiarid midwest of Argentina. *Archives of Environmental Contaminant and Toxicology* 55: 471-480.
- [80] Boone MD (2005) Juvenile frogs compensate for small metamorph size with terrestrial growth: overcoming the effects of larval density and insecticide exposure. *Journal of Herpetology* 39: 416-423.
- [81] Rohr JR, Palmer BD (2005) Aquatic herbicide exposure increases salamander desiccation risk eight months later in a terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(5): 1253-1258.
- [82] Duellman WE, Trueb L (1994) *Biology of Anfibians*. Johns Hopkins University Press, Maryland, USA.
- [83] Sparling DW, Bishop CA, Linder G (2000) The current status of amphibian and reptile ecotoxicological research. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA (eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Press, Pensacola, USA pp 1-13.
- [84] Blaustein AR, Johnson PTJ (2003) The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1(2): 87-94.
- [85] Blaustein AR, Han BA, Relyea RA, Johnson PJT, Buck JC, Gervasi SS, Kats LB (2011) The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223: 108-119.

- [86] Suter II GW (1993) *Ecological Risk Assessment*. Lewis, Boca Raton, USA.
- [87] Fava, JA, Adams WJ, Larson RJ, Dickson GW, Sickson KL, Bishop WE (1987) *Research Priorities in Environmental Risk Assessment*. SETAC Press, Pensacola, USA.
- [88] USEPA US Environmental Protection Agency (1998) Guidelines for Ecological Risk Assessment. <http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/ECOTXTBX.PDF>. [Acceso Setiembre 2012].
- [89] Munn MD, Gilliom RJ, Moran RW, Nowell LH (2006) *Pesticide Toxicity Index for Freshwater Aquatic Organisms*, 2nd edn: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report, Denver, USA.
- [90] Solomon K, Sibley P (2002) New concepts in ecological risk assessment: where do we go from here? *Marine Pollution Bulletin* 44(4): 279-85.
- [91] Newman MC, Clements W (2008) *Ecotoxicology*. CRC Press, Florida, USA pp 1-10.
- [92] Hurtado MA, Giménez JE, Cabral MG (2006) *Análisis Ambiental del Partido de La Plata. Globalización y Agricultura Periurbana en la Argentina*. Consejo Federal de Inversiones, Buenos Aires, Argentina.
- [93] Jergentz S, Pessacq P, Mugni H, Bonetto C, Schulz R (2004) Linking in situ bioassays and population dynamics of microinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 133-141.
- [94] Carriquiriborde P, Diaz J, Mugni H, Bonetto C, Ronco EA (2007) Impact of cypermethrin on stream fish populations under field use in biotech-soybean production. *Chemosphere* 68: 613-621.
- [95] Gonzalez M, Miglioranza KSB, Shimabukuro VM, Quiroz-Lodoño MO, Martinez D, Aizpún JE, Moreno VJ (2011) Surface and groundwater pollution by organochlorine compounds in a typical soybean system from the south Pampa, Argentina. *Environmental Earth Science* 65(2): 481-491.
- [96] Agostini MG (2012) *Ranas y Sapos del Fondo de tu Casa. Anfibios de Agroecosistemas de La Plata y Alrededores*. EDULP, La Plata, Argentina.
- [97] Schulz R (2004) Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: a review. *Journal of Environmental Quality* 33(2): 419-448
- [98] Mugni HA, Ronco AE, Bonetto C (2011) Insecticide toxicity to *Hyaella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 350-354.
- [99] Mugni H, Demetrio P, Marino D, Ronco AE, Bonetto C (2010) Toxicity persistence following an experimental cypermethrin and chlorpyrifos application in Pampasic surface waters (Buenos Aires, Argentina). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84(5): 524-528.
- [100] Demetrio PM (2012) Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la Región Pampeana. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- [101] Mugni H, Paracampo A, Marrochi N, Bonetto C. (2012). Cypermethrin, chlorpyrifos and endosulfan toxicity to two non-target freshwater organisms. *Fresenius Environmental Bulletin* 21(8): 2085-2089.
- [102] Mugni HA, Demetrio P, Bulus G, Ronco AE, Bonetto C (2011) Effect of aquatic vegetation on the persistence of cypermethrin toxicity in water. *Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology* 86: 23-27.
- [103] Relyea RA, Hoverman J (2006) Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters* 9(10): 1157-1171.
- [104] Bridges CM (2000) Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 91-96.

- [105] Relyea RA (2009) A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159(2): 363-376.
- [106] Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest SK (2010) Recent advancements in amphibian and reptile ecotoxicology. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA (eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, 2nd edn*. SETAC Press, California, USA pp 69-103.
- [107] Chen C, Hathaway K, Folt C (2004) Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4): 823-831.
- [108] Wojtaszek BF, Staznik B, Chartrand DT, Stephenson GR, Thompson DG (2004) Effects of Vision herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4): 832-842.
- [109] Widder PD, Bidwell JR (2006) Cholinesterase activity and behavior in chlorpyrifos-exposed *Rana sphenocephala* tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(9): 2446-3454.
- [110] Rohr JR, Sesterhenn T, Stieha C (2011) Will climate change reduce the effects of a pesticide on amphibians?: Partitioning effects on exposure and susceptibility to pollution. *Global Change Biology* 17: 657-666.
- [111] Relyea RA (2005) The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* 15(4): 1118-1124.
- [112] Davidson C, Knap RA (2007) Multiple stressors and amphibian declines: dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs. *Ecological Applications* 17(2): 587-597.
- [113] Relyea RA, Diecks N (2008) An unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations. *Ecological Applications* 18(7): 1728-1742.
- [114] Clements WH, Rohr J (2009) Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9): 1789-1800.
- [115] Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetology* 16:183-190.
- [116] Marino D, Ronco AE (2005) Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75(4): 820-826.
- [117] USEPA US Environmental Protection Agency (1986) *Test methods for evaluating solid waste*. Vol I, Sec. B, Method 3500 (Organic Extraction and Sample Preparation), Method 3550 (Sonication extraction procedure) and 3620 (Clean-up procedure), SW-846. USEPA, Washington DC, USA.
- [118] Meyer MT, Loftin KA, Lee EA, Hinshaw GH, Dietze JE, Scribner EA (2009) *Determination of Glyphosate, its Degradation Product Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate, in Water by Isotope Dilution and Online Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*. US Geological Survey Techniques and Methods, book 5, chap A10, p32.
- [119] USEPA US Environmental Protection Agency (2007a) *Method 3550C Ultrasonic Extraction*. <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3550c.pdf>. [Acceso Enero 2013].
- [120] USEPA US Environmental Protection Agency (2007b) *Method 3620C Florisil Cleanup*. <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3620c.pdf>. [Acceso Enero 2013].
- [121] Coneza Fernandez Vitora V (1997) *Guía Metodológica para la Evaluación de Impacto Ambiental*. Mundi Prensa, Madrid, España.
- [122] Heyer RW, Donnelly MA, McDiarmid RW, Hayek LC, Foster MS (1994) *Measuring and Monitoring Biological Diversity*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, USA.

- [123] Bantle JA, Dumont JN, Finch RA, Linder G, Fort DJ (1998) *Atlas of Abnormalities. A guide for the Performance of FETAX, 2nd edn.* Oklahoma State University, Stillwater, USA.
- [124] Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MHH, White J-SS (2008) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 24:127-135.
- [125] Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM (2009) *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R.* Springer, New York, USA.
- [126] Pinheiro JC, Bates DM (2000) *Mixed-effects Models in S and S-Plus.* Springer, New York, USA.
- [127] Crawley MJ (2007) *The R Book.* Wiley, Chichester, Inglaterra.
- [128] Pinheiro JC, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Development Core Team (2013). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models.* R package version 3.1-108. <http://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>. [Acceso Enero 2013].
- [129] BatesD, Maechler M, Bolker B (2013) *lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes.* R package version 3.1-108. <http://cran.r-project.org/web/packages/lme4/index.html>. [Acceso Enero 2013].
- [130] Sullivan DS, Sullivan TP, Bisalputra T (1981) Effects of Roundup[®] herbicide on diatom populations in the aquatic environment of a coastal forest. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 26: 91-96.
- [131] Hildebrand LD, Sullivan DS, Sullivan TP (1982) Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup[®] herbicide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11: 93-98.
- [132] Mann RM, Bidwell J (1999) The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36(2): 193-199.
- [133] NRA. National Registration Authority for Agricultural & Veterinary Chemicals (1996) *NRA Special Review of Glyphosate. Chemical Review Section.* NRA Press, Canberra, Australia.
- [134] Cauble K, Wagner RS (2005) Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75(3): 429-435.
- [135] Poletta GL, Kleinsorge E, Paonessa A, Mudry MD, Larriera A, Siroski PA (2011) Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(4): 852-859.
- [136] Tsui MTK, Chu LM (2003) Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52(7): 1189-1197.
- [137] Boone MD, Semlitsch RD (2002) Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. *Ecological Applications* 12: 307-316.
- [138] Friberg-Jensen U, Wendt-Rasch L, Woin P, Christoffersen K (2003) Effects of the pyrethroids insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. I. Direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different trophic levels. *Aquatic Toxicology* 63: 357-371.
- [139] Relyea RA (2005) The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15(2): 618-627.
- [140] Rohr JR, Crumrine PW (2005) Effects of a herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applied* 15: 1135-1147.

- [141] Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz R (2005) Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61: 817-826.
- [142] Di Marzio WD, Sáenz ME, Alberdi JL, Fortunato N, Cappello V, Montivero C, Ambrini G. (2010) Environmental impact of insecticides applied on biotech soybean crops in relation to the distance from aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(9): 1907-1917.
- [143] USEPA US Environmental Protection Agency (2002) *Chlorpyrifos Facts. 738-F-01-006*. <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/chlorpyrifos fs.htm>. [Acceso Octubre 2012].
- [144] Wan MT, Kuo J, Pasternak J (2005) Residues of endosulfan and other selected organochlorine pesticides in farm areas of the lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *Journal of Environmental Quality* 34(4): 1186-1193.
- [145] Edginton AN, Stephenson GR, Sheridan PM, Thompson DG, Boermans HJ (2003) Effect of pH and release ((R)) on two life stages of four anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2673-2678.
- [146] Broomhall SD (2004) Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog. *Journal of Applied Ecology* 41: 105-113.
- [147] Bancroft BA, Baker NJ, Blaustein AR (2008) A meta-analysis of the effects of ultraviolet B radiation and other stressors on survival in amphibians. *Conservation Biology* 22: 987-996.
- [148] Hamer AJ, Makings JA, Lane SJ, Mahony MJ (2004). Amphibian decline and fertilizers used on agricultural land in south-eastern Australia. *Agriculture Ecosystems & Environment* 102: 299-305.
- [149] Mugni HA (2008) Concentración de nutrientes y toxicidad de pesticidas en aguas superficiales de cuencas rurales. Tesis doctoral .Universidad Nacional de La Plata.
- [150] Williams DD (2006) *The Biology of Temporary Waters*. Oxford University Press, New York, USA.
- [151] Johnson PTJ, Chase JM (2004) Parasites in the food web: linking amphibian malformations and aquatic eutrophication. *Ecology Letters* 7: 521-526.
- [152] Peltzer PM, Lajmanovich RC, Sánchez-Hernandez JC, Cabagna MC, Attademo AM, 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.
- [153] Ultsch GR, Bradford DF, Freda J (1999) Ecology: resource use, competition and predation. En: McDiarmid RW, Altig R (eds.) *Tadpoles*. The University of Chicago Press, Chicago, USA pp 189-214.
- [154] Lajmanovich RC, Lorenzatti E, De la Sierra P, Marino F, Stringhini G, Peltzer PM (2003c) Reduction in the mortality of tadpoles (*Physalaemus biligonigerus*, Amphibia: Leptodactylidae) exposed to cypermethrin: uptake by aquatic ferns. *Fresenius Environmental Bulletin* 12: 1558-1561.
- [155] Smith G, Weis J (1997) Predator-prey relationships in mummichogs (*Fundulus heteroclitus* (L.)): Effects of living in a polluted environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 209: 75-87.
- [156] Relyea RA (2010) Multiple stressors and indirect food web effects of contaminants on herpetofauna. En: *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, 2nd ed*. Sparling DW, G. Linder G, Bishop CA, Krest SK (eds.). Pensacola, SETAC Press, USA pp 475-486.
- [157] Takahashi M (2007) Oviposition site selection: pesticide avoidance by gray treefrogs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(7): 1476-80.
- [158] Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffle C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjua Y, Parker J, Tsui M (2006) Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives* 114(S-1): 40-50.

- [159] Solomon KR, Carr JA, Du Preez LH, Giesy JP, Kendall RJ, Smith EE, Van Der Kraak G.J (2008) Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Critical Reviews in Toxicology* 38: 721-772.
- [160] Greulich K, Pflugmacher S (2003) Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology* 65(3): 329-336.
- [161] Alford RA (1999) Ecology: resource use, competition and predation. En: McDiarmid RW, Altig R (eds.) *Tadpoles*. The University of Chicago Press, Chicago, USA pp 240-278.
- [162] Pérez GL, Torremorell A, Mugni H, Rodríguez P, Vera MS, do Nascimento M, Allende M, Bustingorry J, Escaray R, Ferraro M, Izaguirre I, Pizarro H, Bonetto C, Morris DP, Zagarese H (2007) Effects of the herbicide roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications* 17(8): 2310-2322
- [163] Vera MS, Lagomarsino L, Sylvester M, Pérez G, Rodríguez P, Mugni H, Sinistro R, Ferraro M, Bonetto C, Zagarese H, Pizarro H (2010) New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19: 710-721.
- [164] Rossa-Feres DC, Jim J, Gonçalves Fonseca M (2004) Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). *Revista Brasileira de Zoologia* 21(4): 745-754.
- [165] Bionda C, Gari N, Luque E, Salas N, Lajmanovich R, Martino A (2012) Ecología trófica en larvas de *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura) en agroecosistemas y sus posibles implicancias para la conservación. *Revista de Biología Tropical* 2: 771-779.
- [166] Brown DD, Cai LQ (2007) Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology* 306: 20-33.
- [167] Yang, FX, Xu Y, Wen S (2005) Endocrine-disrupting effects of nonylphenol, bisphenol A, and p,p-DDE on *Rana nigromaculata* tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75: 1168-1175.
- [168] Helbing CC, Ovaska K, Ji L (2006) Evaluation of the effect of acetochlor on thyroid hormone receptor gene expression in the brain and behavior of *Rana catesbeiana* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 80: 42-51.
- [169] Denver RJ (1997) Environmental stress as a developmental cue: corticotropinreleasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Hormones and Behavior* 31: 169-179.
- [170] Alford RA, Harris RN (1988) Effects of larval growth history on anuran metamorphosis. *American Naturalist* 131: 91-106.
- [171] Taigen TL, Pough FH (1985) Metabolic correlates of anuran behavior. *American Zoologist* 25: 987-997.
- [172] Sandinski WJ, Dunson WA (1992) A multi-level study of effects of low pH on amphibians of temporary ponds. *Journal of Herpetology* 26: 413-422.
- [173] Kupferberg SJ (1997) The role of larval diet in anuran metamorphosis. *American Zoology* 37: 146-159.
- [174] Dash MC, Dei C (1998) Dietary effect on larval growth, body size at metamorphosis and larval duration in *Microhyla ofgrnate* (Amphibia: Anura). *Tropical Ecology* 39:157-164.
- [175] Read JL (1997) Comparative abnormality rates of the trilling frog at Olympic Dam mine. *Herpetofauna* 27: 23-27.
- [176] Johnson PTJ, Reeves MK, Krest SK, Pinkney AE (2010) A decade of deformities. Advances in our understanding of amphibian malformations and their implications. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest SK (eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, 2nd edn*. SETAC Press and CRC Press, New York, USA pp 511-536.

- [177] Bacon JP, Fort CE, Todhunter B, Mathis M, Fort DJ (2013) Effects of multiple chemical, physical, and biological stressors on the incidence and types of abnormalities observed in Bermuda's Cane Toads (*Rhinella marina*). *Journal of Experimental Zoology B: Molecular and Developmental Evolution* 320(4): 218-37.
- [178] Svartz GV, Jorge Herkovits J, Pérez-Coll CS (2012) Sublethal effects of atrazine on embryolarval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology* DOI 10.1007/s10646-012-0880-9.
- [179] Beebee T, Griffiths R (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation* 125(3): 271-285.
- [180] Menzie C, Bettinger N, Fritz A, Kapustka L, Regan H, Moller V, Noel H (2008) Population protection goals. En: Barnthouse LW, Munns W R Sorensen MT (eds.) *Population-Level Ecological Risk Assessment*. CRC Taylor & Francis, Florida, USA pp 41-68.
- [181] Peters RH (1983) *The Ecological Implication of Body Size*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- [182] McCoy KA, Harris RN (2003) Integrating developmental stability analysis and current amphibian monitoring techniques: an experimental evaluation with the salamander *Ambystoma maculatum*. *Herpetologica* 59(1): 22-36.
- [183] Lannoo M (2008) *Malformed Frogs. The Collapse of Aquatic Ecosystems*. University of California Press, Los Angeles, USA.
- [184] Johnson PTJ, Lunde KB, Ritchie EG, Reaser JK, Launer AE (2001) Morphological abnormality patterns in a California amphibian community. *Herpetologica* 57: 336-352.
- [185] Taylor B, Skelly D, Demarchis LK, Slade MD, Galusha D, Rabinowitz PM (2005) Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. *Environmental Health and Perspective* 113: 1497-1501.
- [186] Piha H, Pekkonen M, Merila J (2006) Morphological abnormalities in amphibians in agricultural habitats. A case study of the common frog *Rana temporaria*. *Copeia* 4: 810-817.
- [187] Fabrezi M (1999) Duplicación de la extremidad anterior en *Lepidobatrachus llanensis* (Anura: Leptodactylidae). *Cuadernos de Herpetología* 13(1-2): 99-110.
- [188] Attademo A, Peltzer P, Lajmanovich R (2004) Nuevo caso de malformación en un ejemplar de rana (*Leptodactylus ocellatus*) (Amphibia: Anura) del Litoral Argentino. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 15(1): 19-22.
- [189] Peltzer PM, Lajmanovich RC, Sanchez LC, Attademo AM, Junges CM, Bionda CL, Martino AL, Bassó A (2011) Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. *Herpetological Conservation and Biology* 6(3): 432-442.
- [190] Lajmanovich RC (1994) Contribución al conocimiento de la alimentación de larvas de la rana criolla *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Leptodactylidae) en el Paraná medio, Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 29(1): 55-61.
- [191] Lajmanovich RC (2000) Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia* Marzo-abril: 71-79.
- [192] da Rosa I, Canavero A, Maneyro R, Naya D, Camargo A (2002) Diet of four sympatric anurans species in a temperate environment. *Boletín de la Sociedad Zoológica de Uruguay* 13: 12-20.
- [193] Maneyro R, Naya DE, Rosa ID, Canavero A, Camargo A (2004) Diet of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura, Leptodactylidae) in Uruguay. *Iheringia. Série Zoologia* 94(1): 57-61.
- [194] Donnelly MA (1989) Demographic effects of reproductive resource supplementation in a territorial frog, *Dendrobates punilio*. *Ecological Monograph* 59: 207-221.

- [195] Mccarthy MA, Parris KM (2004) Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. *Journal of Applied Ecology* 41(4): 780-786.
- [196] Meteyer CU, Loeffler IK, Fallon JF, Converse KA, Green E, Helgen JC, Kersten S, Levey R, Eaton-Poole L, Burkhart JG (2000) Hind limb malformations in free-living northern leopard frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. *Teratology* 62: 151-171.
- [197] Otis DL, Burnham KP, White GC, Anderson DR (1978) Statistical inference from capture data on closed animal populations. *Wildlife Monograph* 62: 1-135.
- [198] White GC, Burnham KP (1999) Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46: 120-138.
- [199] Cooch E, White G (2004) Program MARK: a Gentle Introduction, 3rd edn. <http://www.phidot.org/software/mark/docs/book/>. [Acceso Diciembre 2011].
- [200] Williams BK, Nichols JD, Conroy MJ (2002) *Analysis and Management of Vertebrate Populations*. Academic Press, San Diego, USA.
- [201] Pledger S (2000) Unified maximum likelihood estimates for closed capture-recapture models for mixtures. *Biometrics* 56: 434-442.
- [202] Fulton MH, Key PB (2001) Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(1): 37-45.
- [203] Christin MS, Menard L, Gendron AD, Ruby S, Cyr D, Marcogliese D, Rollins-Smith L, Fournier M (2004) Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic Toxicology* 67: 33-43.
- [204] Rohr JR, Raffel TR, Romansic JM, McCallumH, Hudson PJ (2008) Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 17436-17441.
- [205] Llamas MC, de Castro AC, Pechen de D'Angelo AM (1985) Cholinesterase activities in developing amphibian embryos following exposure to the insecticides dieldrin and malathion. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 14(2): 161-166.
- [206] Venturino A, Pechen de D'Angelo AM (2005) Biochemical targets of xenobiotics: biomarkers in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology* 2: 335-353.
- [207] Kiesecker JM (2010) Global stressors and the global decline of amphibians: tipping the stress immunocompetency axis. *Ecological Research* 26: 897-908.
- [208] Goodman BA, Johnson PTJ (2011) Disease and the extended phenotype: parasites control host performance and survival through induced changes in body plan. *PlosOne* <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0020193>. [Acceso Marzo 2013].
- [209] Aronzon CM, Sandoval MT, Herkovits J, Pérez-Coll C (2010). Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American Toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology* DOI 10.1002/tox.
- [210] Gurushankara HP, Krishnamurty SV, Vasudev V (2007) Morphological abnormalities in natural populations of common frog inhabiting agoecosystems of central Western Ghats. *Applied Herpetology* 4: 39-45.
- [211] Johnson PTJ, Lunde KB, Zelmer DA, Werner JK (2003) Limb deformities as an emerging parasitic disease in amphibians: Evidence from museum specimens and resurvey data. *Conservation Biology* 17: 1724-1737.

- [212] Michel MJ, Burke S (2011) Consequences of an amphibian malformity for development and fitness in complex environments. *Freshwater Biology* 56: 1417-1425.
- [213] Ankley GT, Diamond SA, Tietge JE, Holcombe GW, Jensen KM, DeFoe DL, Peterson R (2002) Assessment of the risk of solar ultraviolet radiation to amphibians. I. Dose-dependent induction of hindlimb malformations in the northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Environmental Science and Technology* 36(13): 2853-2858.
- [214] Kiesecker JM (2002) Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:9900-9904.
- [215] Relyea RA (2003) Predator cues and pesticides: A double dose of danger for amphibians. *Ecology Applied* 13: 1515-1521.
- [216] Sinsch U (1990) Migration and orientation in anuran amphibians. *Ethology Ecology & Evolution* 2(1): 65-69.
- [217] Odum EP, Barrett GW (2006) *Fundamentos de Ecología*. Thomson Editores, México DF. México.
- [218] Harris M, Bishop C, Struger J (1998) The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) populations in orchard wetlands. II. Effects of pesticides and eutrophic conditions on early life stage. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(7): 1351-1363.
- [219] Houlahan JE, Findlay CS (2003) The effects of adjacent land use on wetland amphibian species richness and community composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60: 1078-1094.
- [220] Odum EP (1971) *Fundamentals of Ecology*. Saunders Company, London, Inglaterra.
- [221] Bellwood DR, Hughes TP (2001) Regional-scale assembly rules and biodiversity of coral reefs. *Science* 292: 532-534.
- [222] Clements WH, Newman MC (2002) *Community Ecotoxicology*. Wiley & Sons Ltd, Inglaterra.
- [223] Luoma SN (1996) The developing framework of marine ecotoxicology: Pollutants as a variable in marine ecosystems? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 200: 29-55.
- [224] Karr JR (1993) Defining and assessing ecological integrity: Beyond water quality. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 1521-1531.
- [225] Karr JR, Dudley DR (1981) Ecological perspective on water quality goals. *Environmental Management* 5: 55-68.
- [226] Magurran AE (1988) *Ecological Diversity and its Measurement*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- [227] Boyle TP, Smillie GM, Anderson JC, Beeson DR (1990) A sensitivity analysis of nine diversity and seven similarity indices. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation* 62:749-762.
- [228] Moreno C (2002) *Métodos para Medir la Biodiversidad*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Zaragoza, España.
- [229] Feinsinger P (2003) *El Diseño de Estudios de Campo para la Conservación de la Biodiversidad*. Editorial FAN, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.
- [230] Cabrera ÁL, Willink A (1980) *Biogeografía de América Latina. 2a edn corregida*. Monografía 13. Serie de Biología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington DC, USA.
- [231] Thornthwaite C, Mather J (1955) *Instructions and Tables for Computing Potential Evapotranspiration and Water Balance*. Laboratory of Climatology, VIII, 1, New Jersey, USA.

- [232] Wells KD (2007) *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- [233] Hernández F, Pozo OJ, Sancho JV, Bijlsma L, Barreda M, Pitarch E (2006) Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *Journal of Chromatography A* 1109: 242-252.
- [234] Furlong ET, Anderson BD, Werner SL, Soliven PP, Coffey LJ, Burkhardt MR (2001) *Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory: Determination of Pesticides in Water by Graphited Carbon-Based Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*. U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations Report 01-4134, Colorado, USA.
- [235] Soberon M.J, Llorente BJ (1993) The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conservation Biology* 7: 480-488.
- [236] Colwell RK, Coddington JA (1995) Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. En: Hawksworth DL (ed.) *Biodiversity Measurement and Estimation*. Chapman & Hall, London, Inglaterra pp 118-133.
- [237] Colwell RK (2000). *Estimates: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples*. <http://purl.oclc.org/estimate>. [Acceso Mayo 2013]
- [238] Feinsinger P (2001) *Designing Field Studies for Biodiversity Conservation*. The Nature Conservancy and Island Press, Washington DC, USA.
- [239] Seaby RM, Henderson PA (2006) *Species Diversity and Richness Version 4*. Pisces Conservation Ltd., Lymington, Reino Unido.
- [240] Solow (1993) Using a Margalef D index with 10000 random partitions. *Journal of Animal Ecology* 62: 191-193.
- [241] ter Braak CJF, Smilauer P (1998) *Software for Canonical Community Ordination (version 4.53)*. Microcomputer Power, Ithaca, USA.
- [242] Leps J, Smilauer P (2003) *Multivariate Analysis of Ecological Data Using CANOCO*. Cambridge University Press, Cambridge
- [243] Rapport DJ, Regier HA, Hutchinson TC (1985) Ecosystem behavior under stress. *The American Naturalist* 125: 617-640
- [244] Agostini MG, Barrasso D, Saibene P (2011) Anfibios de la Reserva Natural Punta Lara. En: Roesler I, Agostini MG (eds.) *Inventario de los Vertebrados de la Reserva Natural Punta Lara. Provincia de Buenos Aires, Argentina*. Temas de Naturaleza y Conservación 8. Aves Argentinas/Asociación Ornitológica del Plata, Buenos Aires, Argentina pp 63-74.
- [245] Vaira *et al.* (2012) Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26(1): 131-159.
- [246] Saibene PE, Agostini MG, Roesler I & Natale GS (2008) Anfibiofauna del oeste de la provincia de Buenos Aires. IX Congreso Argentino de Herpetología. San Luis (Argentina).
- [247] Maneyro R, Carreira S (2012) *Guía De Anfibios Del Uruguay*. Ediciones de la Fuga. Montevideo, Uruguay.
- [248] Motomura I (1932) On the statistical treatment of communities. *Zoology Mag Tokyo* 44: 379-383.
- [249] May RM (1973) *Stability and Complexity in Model Ecosystems*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- [250] Newman MC (1995) *Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology*. CRC Publishers Inc, Boca Raton, USA.

- [251] Elith J, Leathwick JR (2009) Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40(1): 677-697.
- [252] Cohen JM, Pinkerton C (1966) Widespread translocation of pesticides by air transport and rain-out. En: Aaron AR, Kraybill HF (eds.) *Organic Pesticides in the Environment*. American Chemical Society, Ohio, USA pp 163-176.
- [253] Coupe RH, Manning MA, Foreman WT, Goolsby DA, Majewski MS (2000) Occurrence of pesticides in rain and air in urban and agricultural areas of Mississippi. *Science of the Total Environment* 248(2-3): 227-240.
- [254] Majewski MS, Foreman WT, Goolsby DA (2000) Pesticides in the atmosphere of the Mississippi River Valley, part I - rain. *Science of the Total Environment* 248(2-3): 201-212.
- [255] Gil Y, Sinfort V (2005) Emission of pesticides to the air during sprayer application: A bibliographic review. *Atmospheric Environment* 39(28): 5183-5193.
- [256] Ficetola FG, De Bernardi F (2004) Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. *Biological Conservation* 119(2): 219-230.
- [257] Hartel T, Nemes S, Cogălniceanu D, Öllerer K, Moga CI, Lesbarrères D, Demeter L (2009) Pond and landscape determinants of *Rana dalmatina* population sizes in a Romanian rural landscape. *Acta Oecologica* 35(1): 53-59.
- [258] Dahl T (2000) *Status and Trends of Wetlands in the Conterminous United States 1986–1997*. US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington DC, USA.
- [259] Viglizzo EF, Lértora FA, Pordomingo AJ, Bernardos JN, Roberto ZE, Del Valle H. (2001) Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the Pampas of Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 83: 65-81.
- [260] Pengue W (2009) Cuestiones económico-ambientales de las transformaciones agrícolas en las pampas. *Problemas del Desarrollo* 40 (157): 137-161
- [261] Sobrero MC, Rimoldi F, Ronco AE (2007) Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemna gibba* L. at different exposure levels and assessment endpoints. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 79:537-543.
- [262] Martin ML (2011) Impacto del uso de plaguicidas asociados al cultivo de soja transgénica sobre especies no blanco de la flora riparia y acuática. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- [263] Suter II GW (1999) Developing conceptual models for complex ecological risk assessments. *Human and Ecological Risk Assessment* 5(2): 375-396.
- [264] IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry (2007) Glossary of terms used in toxicology. *Pure Applied Chemistry* 79(7): 1153-1344.
- [265] Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE (2008) Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156: 61-66.
- [266] USEPA US Environmental Protection Agency (1993) *RED Fact Glyphosate*. US EPA. <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/0178fact.pdf>. [Acceso Diciembre 2012].
- [267] Kamrim MA (1997) *Pesticide Profiles; Toxicity, Environmental Impact and Fate*. Lewis, Boca Raton, USA.
- [268] Sparling DW, Fellers G (2007) Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylii*. *Environmental Pollution* 147(3): 535-539.
- [269] Broomhall SD, Shine R (2003) Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45: 221-226.

- [270] Relyea RA (2004) Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1737-1742.
- [271] Mann RM (2005) Methodological approaches in amphibian toxicology. *Applied Herpetology* 223-230.
- [272] Bridges CM, Boone MD (2003) The interactive effects of UV-B and insecticide exposure on tadpole survival, growth and development. *Biology Conservation* 113: 49-54.
- [273] Boone MD, Semlitsch RD, Fairchild JF, Rothermel BB (2004) Effects of an insecticide on amphibians in large-scale experimental ponds. *Ecological Applications* 14: 685-691.
- [274] Boone MD, Semlitsch RD (2001) Interactions of an insecticide with larval density and predation in experimental amphibian communities. *Conservation Biology* 15: 228-238.
- [275] Chambers JE, Carr RL (1995) Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology* 105(2-3): 291-304.
- [276] Relyea RA, Mills M (2001) Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98(5): 2491-2496.
- [277] Berrill M, Coulson D, McGillivray L, Pauli B (1998) Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 1738-1744.
- [278] Ware GW, Whitacre DM (2004) An introduction to herbicides. En: Ware GW, Whitacre DM (eds.) *The Pesticide Book*. MeisterPro Information Resources, Willoughby, USA pp 125-198.
- [279] Dinehart SK, Smith LM, McMurry ST, Anderson TA, Smith PN, Haukos DA (2009). Toxicity of a glufosinate- and several glyphosate-based herbicides to juvenile amphibians from the Southern High Plains, USA. *The Science of the Total Environment* 407(3): 1065-1071.
- [280] Schneider M, Sánchez N, Pineda S, Chi H, Ronco A (2009) Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological Approach. *Chemosphere* 76(10): 1451-1455.
- [281] Thompson DG, Holmes SB, Pitt DG, Solomon KR, Wainio-KeizerKL (1994) Applying concentration-response theory to aquatic enclosure studies. En Graney RL, Kennedy JH, RodgersJH Jr (eds.) *Aquatic Mesocosm Studies in Ecological Risk Assessment*. SETAC Special Publications. Lewis, Boca Raton,FL, USA, pp 129–156.
- [282] Tilman D (1999) Global environmental impacts of agricultural expansion. The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 5995-6000.
- [283] FAO Food and Agricultural Organization of the United Nations (2009). *FAO Statistical Databases & Data Sets*. ProdSTAT–Crops. <http://faostat.fao.org/>.
- [284] Harris ML, Chora L, Bishop CA, Bogart JP (2000) Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64: 263-270.
- [285] Begon M Townsend CR, Harper JL (2006) *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA:

ABREVIATURAS

ACD: análisis de correspondencia sin tendencia

AIC: criterio de información de Akaike

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

ARD: análisis de redundancia

CASAFE: Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

CL₅₀: Concentración Letal Media

CLOR: clorpirifós

CY: cipermetrina

END: endosulfán

FAO: Food and Agricultural Organization

GLY: glifosato

IRAM: Instituto Argentino de Racionalización de Materiales

LHC: longitud del cuerpo, hocico-cloaca

lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes

MLG: modelos lineales generalizados

MLGM: modelo lineal generalizado mixto

MLGrM: modelo lineal general mixto

nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models

NRA: National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals

OMS: Organización mundial de la salud

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

USEPA: United States Environmental Protection Agency

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA VINCULADA AL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- Agostini MG, Natale GS, Ronco AE (2005) Efectos letales y subletales del insecticida clorpirifos sobre larvas de *Hyla pulchella* (Anura: Hylidae). Congreso Latinoamericano SETAC. Santiago de Chile (Chile)
- Agostini MG, Paracampo AH, Natale GS, Ronco AE (2008) Efectos letales del formulado comercial Round up®Max, del principio activo y su surfactante POEA sobre larvas de *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). IX Congreso Argentino de Herpetología. San Luis (Argentina)
- Paracampo AH, Agostini MG, Natale GS, Ronco A (2008) Efecto letal agudo del herbicida Roundup® sobre larvas de *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). V Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos. Lujan (Argentina)
- Agostini MG, Drovandi J, Ciai DN, Natale GS, Ronco AE (2010) Frecuencia de malformaciones en poblaciones de anfibios anuros de agroecosistemas. XI Congreso Argentino de Herpetología. Buenos Aires (Argentina)
- Agostini MG, Marino D, Bonetto C, Ronco AE (2011) Efectos de plaguicidas sobre la supervivencia, el movimiento y desarrollo de anomalías en anfibios de la Región Pampeana Argentina. Congreso Latinoamericano de Ecotoxicología. Cumaná (Venezuela)
- Agostini MG, Bonetto, Ronco AE (2011) Efectos de cipermetrina y glifosato en poblaciones naturales de *Hypsiboas pulchellus* y *Leptodactylus latrans*. XI Congreso Argentino de Herpetología. Bariloche (Argentina)

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- Agostini MG, Natale G, Ronco AE (2009) Impact of endosulphan and cypermethrin mixture on amphibians under field use for biotech soya bean production. *International Journal of Environmental and Health* 3(4): 279-289
- Agostini MG, Kacoliris, F, Demetrio P, Natale G, Bonetto C, Ronco AE (2013) Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems from Northeastern of Buenos Aires province, Argentina DOI: 10.3354/dao02592
- Agostini MG, Natale GS, Ronco AE (2010) Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology* 19: 1540-1550

LIBROS

- Agostini MG (2012). Ranas y Sapos del Fondo de tu Casa. Anfibios de Agroecosistemas de los Alrededores de La Plata. EDULP, La Plata

