



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

**Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas**

**ESTUDIOS ECOTOXICOLÓGICOS *IN SITU* EN REDES HÍDRICAS  
ASOCIADAS A LA ACTIVIDAD MINERA EN LA PROVINCIA DE  
CÓRDOBA, ARGENTINA**

Lic. Favio Ezequiel POLLO

DIRECTOR: Dr. Adolfo Ludovico MARTINO

CODIRECTOR: Dra. Nancy Edith SALAS

Río Cuarto, Noviembre de 2017

COMISION ASESORA Y JURADO

**Dra Paola Mariela PELTZER** Universidad Nacional del Litoral, Facultad de bioquímica y Ciencias Biológicas. Santa Fe, Argentina.

Firma

Aclaración

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

Firma

Aclaración

**Dr. Jorge CONIGLIO** Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas FísicoQuímicas y Naturales. Córdoba, Argentina

Firma

Aclaración

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha: Universidad Nacional de Río Cuarto, 28 de Noviembre de 2017

Calificación.....

*A Caro y Augusto*

*A mis padres*

*"Haz sólo lo que amas y serás feliz,  
y el que hace lo que ama,  
está benditamente condenado al éxito,  
que llegará cuando deba llegar,  
porque lo que debe ser será,  
y llegará naturalmente"*

*-Facundo Cabral*

## **AGRADECIMIENTOS**

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

*A* la Universidad Nacional de Río Cuarto, porque me dio la posibilidad de estudiar y por permitir mi formación profesional.

*A* los integrantes de la Comisión Evaluadora. Por acompañarme y guiarme en la realización de este trabajo.

*A* mi director Adolfo Martino, por todo el tiempo ofrecido, aportes y observaciones para el desarrollo de este trabajo.

*A* mi co-director Nancy Salas, gracias por su apoyo y tiempo dedicado. Por haberme brindado su conocimiento y experiencia.

*A* mis padres, que con sacrificio hicieron posible lo que hoy he logrado.

*A* mis hermanos y cuñados por el apoyo y cariño brindado.

*A* mi Sobrinos, que con sus sonrisas alegran mis días.

*A* cada uno de los personajes de la cátedra de Ecología, por su colaboración en las campanas ayudando desinteresadamente siempre que lo necesite y por todos estos momentos compartidos.

*A* Luciana por sus horas dedicadas a una parte de mi tesis

*A* mis compañeros y amigos, que siempre estuvieron conmigo, gracias por su amistad y apoyo en todo momento.

*A* Caro, sin duda mi más importante compañía, a quien amo y admiro profundamente.

*A* Augusto!! Fuente de alegrías.

## RESUMEN

En los últimos años el uso de técnicas biológicas no letales, como los biomarcadores, han ganado popularidad dentro del campo de la ecotoxicología, por su valor como señales tempranas de efectos antrópicos de contaminación. El flúor es uno de los elementos más abundantes en los ambientes. Este elemento promueve el crecimiento y desarrollo de los seres humanos y animales. Sin embargo, estudios de laboratorio informan que en cantidades excesivas produce efectos tóxicos en todos los organismos. Los estudios en laboratorios no siempre generan información ecológicamente relevante, ya que las situaciones de campo pueden no ser simuladas con precisión en el laboratorio. Este trabajo doctoral ha permitido estudiar *in situ*, el efecto de sistemas de redes hídricas ricos en flúor, cuyo aporte y transporte puede ser natural y/o artificial, sobre dos especies representativas de la provincia de Córdoba (*Rhinella arenarum* e *Hypsiboas cordobae*), evaluando un conjunto de respuestas biológicas (biomarcadores morfológicos, genotóxicos, citotóxicos y de comportamiento trófico), complementado con 16 parámetros fisicoquímicos medidos en el agua. Se muestrearon cuatro sitios asociados con la mina de fluorita: arroyo Los Cerros Negros que circula sobre roca granítica con alto contenido de flúor natural; arroyo Las Hylas y Los Vallecitos que discurren sobre roca metamórfica con bajo contenido de flúor; y las Piletas de decantación, sitio artificial, en el cual desaguan las aguas producto del proceso de flotación de fluorita. Se analizó la sangre de adultos de *R. arenarum* e *H. cordobae* y renacuajos de *H. cordobae*. Se calculó frecuencias de micronúcleos, anomalías nucleares eritrocitarias, eritrocitos mitóticos, inmaduros y anucleados. Se contabilizó el grado e intensidad de infestación de hemoparásitos. A los individuos se les registró el sexo, estadio, largo total y peso. Además, se examinaron cuidadosamente para reconocer anomalías morfológicas. Los resultados de este estudio indican que los individuos de ambas especies de las Piletas de decantación están expuestos a mezclas de compuestos que están alterando el normal desarrollo, en comparación con los individuos de los arroyos naturales que circulan sobre roca metamórfica. Los individuos de *R. arenarum* que habitan el arroyo Los Cerros Negros presentaron frecuencias de anomalías morfológicas muy por encima de los límites basales. La etapa larval fue más vulnerable que la fase adulta y podría estar relacionada con el mayor tiempo de exposición a las sustancias, que pueden penetrar fácilmente por piel, boca y branquias; Los biomarcadores de comportamiento trófico permitieron distinguir la composición de la dieta de larvas en las Piletas de decantación del Arroyo Los Cerros Negros, encontrando taxones asociados a ambientes perturbados y otros taxones afectados por las elevadas concentraciones de flúor. El análisis en conjunto de las respuestas biológicas y parámetros fisicoquímicos permitió definir a los sitios Piletas de decantación y Los Cerros Negros como sitios desfavorables para el desarrollo normal de los anfibios locales. Aunque es importante destacar que el sitio artificial, es un ambiente elegido por los anfibios locales. Por lo tanto sería de suma importancia estudios acerca de la longevidad poblacional y *fitness* reproductivo de estas poblaciones.

## Abstract

In recent years, the uses of non-lethal biological techniques, such as biomarkers, have gained attention within the field of ecotoxicology due to their value as early signals of anthropic effects. Fluoride is one of the most abundant elements in environment. This element, promotes growth and development of humans and animals. However, laboratory studies report that in excessive amounts produces toxic effects in all organisms. Laboratory studies do not always generate ecologically relevant information, since field situations may not be accurately simulated in the laboratory. This work has allowed to study in situ, the effect of systems of water networks rich in fluoride, whose contribution and transport can be natural and / or artificial, on two representative species of the province of Córdoba (*Rhinella arenarum* and *Hypsiboas cordobae*), evaluating a set of biological responses (morphological, genotoxic, cytotoxic and trophic behavior biomarkers), complemented with 16 physicochemical parameters measured in water. Four stations associated with fluoride mine sampling were sampled: a stream running on granitic rock with natural high fluoride content; two streams both running on metamorphic rock with low fluoride content; and an artificial decantation pond containing sediments produced by fluoride flotation process with high variation in physicochemical parameters. Adult blood of *R. arenarum* and *H. cordobae* and *H. cordobae* tadpoles were analyzed. Frequencies of micronuclei, erythrocyte nuclear abnormalities, mitosis, immature and enucleated erythrocytes were calculated. Degree and intensity of hemoparasite infestation was recorded. Individuals were recorded for sex, stage, total length and weight. In addition, they were examined carefully to recognize morphological abnormalities. The results of this study indicate that individuals of both species of the settling Decantation ponds are exposed to mixtures of compounds that are altering the normal development, compared to the individuals of the natural streams that circulate on metamorphic rock. Individuals of *R. arenarum* that inhabit the stream Los Cerros Negros presented frequencies of morphological abnormalities well above the basal limits. Larval stage, was more vulnerable than adult phase and could be related to the longer exposure to substances, which can easily penetrate through skin, mouth and gills; Biomarkers of trophic behavior, allowed to distinguish the diet composition of larvae in the decantation ponds of the Los Cerros Negros Stream, finding taxa associated with disturbed environments and other taxa affected by high concentrations of fluoride. Conjunct analysis of the endpoints and chemical physical parameters allowed defining the sites, decantation ponds and Los Cerros Negros streams as sites unfavorable for the normal development of the local amphibians. Although it is important to note that artificial site is an environment selected by local amphibians. Therefore, studies on population longevity and reproductive fitness of these populations would be extremely important.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>Índice Tablas</b>	ix
<b>Índice Figuras</b>	x
<b>Resumen</b>	xiii
<b>Abstract</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Ecosistemas acuáticos	2
1.2. Ecotoxicología y Bioindicadores	3
1.3. Biomarcadores	6
1.3.1. Biomarcadores Genotóxicos	8
1.3.2. Biomarcadores Morfológicos	10
1.4. Antecedentes	11
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	13
2.1. Hipótesis	14
2.2. Objetivo General	14
2.3. Objetivos específicos	14
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1. Descripción del Área	18
3.1.1. Caracterización de la zona de estudio	19
3.1.2. Sitios de muestreo	26
3.2. Descripción de las especies en estudio	29
3.2.1. <i>Rhinella arenarum</i>	29
3.2.1.1. Sistemática	29
3.2.1.2. Características generales de la especie	29
3.2.2. <i>Hypsiboas cordobae</i>	31
3.2.2.1. Sistemática	31
3.2.2.2. Características generales de la especie	31

3.3. Procedimientos de campo	32
3.4. Biomarcadores morfológicos	34
3.4.1. Condición Corporal	34
3.4.2. Anormalidades	34
3.5. Procedimiento de Laboratorio	35
3.5.1. Análisis químico de laboratorio	35
3.5.2. Variables ambientales	35
3.5.3. Obtención de sangre	36
3.5.4. Biomarcadores Genotóxicos	37
3.5.5. Biomarcadores Citotóxicos	38
3.5.6. Biomarcadores de comportamiento trófico en larvas	39
3.5.7. Hemoparasitos	41
3.5.8. Trabajo experimental: Prueba de AMPHITOX modificado	42

#### **4. RESULTADOS**

4.1 Caracterización de los sitios de muestreo	44
4.2 Variables fisico-químicas	46
4.3 Biomarcadores morfológico	54
4.3.1. <i>Rhinella arenarum</i>	54
4.3.1.1. Larvas	54
4.3.1.2. Metamorfoseados	54
4.3.1.3. Adultos	54
4.3.2. <i>Hypsiboas cordobae</i>	56
4.3.2.1. Larvas	56
4.3.2.2. Metamorfoseados	57
4.3.2.3. Adultos	57
4.3.3. Anormalidades	58
4.4. Biomarcadores de comportamiento trófico en larvas	62
4.5. Variables ambientales versus ecología trófica de larvas	72
4.6 Biomarcadores Genotóxicos	75
4.6.1. <i>Rhinella arenarum</i>	75
4.6.1.1. Larvas	75

4.6.1.2. Adultos	75
4.6.2. <i>Hypsiboas cordobae</i>	77
4.6.2.1. Larvas	77
4.6.2.2. Adultos	77
4.7 Biomarcadores Citotóxicos	80
4.7.1. <i>Rhinella arenarum</i>	81
4.7.1.1. Adultos	81
4.7.2. <i>Hypsiboas cordobae</i>	82
4.7.2.1. Larvas	82
4.7.2.2. Adultos	82
4.8 CCA	83
4.8.1 CCA <i>Rhinella arenarum</i>	83
4.8.2. CCA <i>Hypsiboas cordobae</i>	84
4.9. Hemoparasitos	85
4.10. Trabajo experimental: Prueba de AMPHITOX modificado	87
<b>5. DISCUSIÓN</b>	
5.1. Caracterización de sitios y calidad de agua en la zona de estudio	92
5.1.1. Caracterización de sitios	92
5.1.2 Calidad del agua	94
5.2. Biomarcador morfológico	98
5.3. Biomarcadores de comportamiento trófico en larvas	101
5.4. Biomarcadores Genotóxicos	104
5.5. Biomarcador Citotóxico	107
5.6. Hemoparasitos	108
5.7. Consideraciones finales y Conclusiones	111
5.8. Recomendaciones	114
<b>Referencias Bibliográficas</b>	117

## COPIAS DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- Trophic ecology of syntopic anuran larvae, *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) and *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae): its relation to the structure of periphyton. 2015. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*. 51: 211–217.
- Assessment *in situ* of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. 2016. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133: 466–474.
- Evaluation *in situ* of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine. 2017. *Environmental Science and Pollution Research*. 1-9.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Páginas
1	Variables de caracterización y descripción de cada sitio de muestreo.	45
2	Valores medios, desvió estándar, máximo y mínimo de las variables físico-químicas registradas <i>in situ</i> .	48
3	Análisis físico-químico de laboratorio.	51
4	Clasificación del agua de los sitios muestreados.	52
5	Valores de los autovectores de las componentes principales.	53
6	Valores medios para el largo hocico-cloaca, peso y condición corporal por sexo para <i>R. arenarum</i> .	55
7	Medias para el largo hocico-cloaca, peso y condición corporal por sexo para <i>H. cordobae</i> .	57
8	Porcentaje relativo de las anormalidades morfológicas en <i>R. arenarum</i> por sitio muestreado.	59
9	Análisis cualitativo de las muestras de vegetación, rocas y sedimento para cada sitio de muestreo.	64-65
10	Frecuencia media de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de adultos de <i>R. arenarum</i> en cada uno de los sitios de muestreo.	76
11	Frecuencia media de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de adultos de <i>H. cordobae</i> en cada uno de los sitios de muestreo.	77
12	Frecuencia media de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de larvas de <i>H. cordobae</i> en cada uno de los sitios de muestreo.	78
13	Frecuencias media de eritrocitos inmaduros, mitóticos y anucleados de <i>R. arenarum</i> .	81
14	Frecuencia media de eritrocitos inmaduros, mitóticos y anucleados de larvas y adultos de <i>H. cordobae</i> .	82
15	Prevalencia e intensidad de infestación de hemoparasitos intracelulares en <i>H. cordobae</i> .	86
16	Prevalencia e intensidad de infestación de hemoparasitos extracelulares en <i>H. cordobae</i> .	86
17	Frecuencia media de micronúcleos, anormalidades nucleares eritrocitarias totales, eritrocitos inmaduros, eritrocitos mitóticos y anucleados de larvas de <i>R. arenarum</i> expuestas a diferentes concentraciones en laboratorio.	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación gráfica de las posibles vías de formación de micronúcleos	9
2	Geología del batolito Cerro Áspero (BCA) y ubicación de los principales depósitos de fluorita	18
3	Localización de las principales redes hídricas de la zona de estudio	21
4	Instalaciones del emprendimiento minero Fluorita Córdoba	22
5	Planta de trituración de la fluorita	23
6	Proceso de flotación de la fluorita	24
7	Proceso de secado, almacenamiento y envasado de la fluorita	25
8	Fotografía del arroyo Las Hylas	28
9	Fotografía del arroyo Los Vallecitos	28
10	Fotografía del arroyo Los Cerros Negros antes de la mina	28
11	Fotografía del arroyo Los Cerros Negros en la mina	28
12	Fotografía de las Piletas de decantación vegetadas	28
13	Fotografía de un individuo adulto de <i>R. arenarum</i>	29
14	Fotografía de un individuo adulto de <i>H. cordobae</i>	31
15	Representación gráfica de los gremios morfológicos	40
16	Precipitaciones mensuales por año de muestreo	46
17	Gráfico de puntos de las variables físico-químicas registradas <i>in situ</i> en los diferentes años de muestreos	49-50
18	Biplot de las variables ambientales y los sitios muestreados	53
19	Valores medios del largo hocico-cloaca, el peso y condición Corporal registrados en los adultos de <i>R. arenarum</i> .	55
20	Longitud total de larvas de <i>H. cordobae</i> en cada sitio de muestreo	56
21	Valores medios del largo hocico-cloaca, peso y condición corporal registrados en los adultos de <i>H. cordobae</i>	58
22	Fotografía de las anomalías morfológicas registradas en adultos de <i>R. arenarum</i>	60

23	Fotografía de las anomalías morfológicas registradas en larvas de <i>H. cordobae</i>	61
24	Análisis discriminante de los distintos ítems alimenticios para las larvas de ambas especies.	62
25	Curvas de rarefacción de las dos especies <i>R. arenarum</i> e <i>H. cordobae</i> .	63
26	Diagramas de rango abundancia para los ítems alimenticios de larvas de <i>R. arenarum</i> e <i>H. cordobae</i> del sitio las Piletas de decantación.	66
27	Diagrama de rango abundancia para de los ítems alimenticios de larvas de <i>H. cordobae</i> de Los arroyos.	66
28	Ordenación de los ítems consumidos por <i>H. cordobae</i> en los arroyos de roca metamórfica de los de roca granítica.	67
29	Diagrama de rango abundancia para la proporción de los ítems alimenticios de larvas de <i>R. arenarum</i> e <i>H. cordobae</i> del sitio Piletas de decantación.	68
30	Diagrama de rango abundancia para la proporción de los ítems alimenticios de larvas de <i>H. cordobae</i> de los arroyos que circulan sobre roca metamórfica y de los que circulan sobre roca granítica.	69
31	Proporción de cada gremio morfológico para las larvas de <i>R. arenarum</i> e <i>H. cordobae</i> .	70
32	Tamaño de las algas consumidas por las larvas de <i>R. arenarum</i> e <i>H. cordobae</i> del sitio arroyos y piletas.	71
33	Triplot de los sitios, taxones más abundantes registrados en la dieta de larvas y los parámetros de agua	73
34	Anormalidades nucleares eritrocitarias de <i>R. arenarum</i> e <i>H. cordobae</i> .	74
35	Gráfico de barras para la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares eritrocitarias en adultos de <i>R. arenarum</i> .	76
36	Gráfico de barras para la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares eritrocitarias en larvas de <i>H. cordobae</i> .	77
37	Gráfico de barras para la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares eritrocitarias en adultos de <i>H. cordobae</i> .	79
38	Eritrocitos inmaduros, mitóticos y anucleados de <i>R. arenarum</i> e <i>H. cordobae</i> .	80
39	Triplot de los sitios, variables ambientales y variables biológicas en adultos de <i>R. arenarum</i> .	83

40	Triplot de los sitios, variables ambientales y variables biológicas en adultos y larvas de <i>H. cordobae</i>	84
41	Fotografías de protozoarios observados en los extendidos de sangre periférica de <i>H. cordobae</i> .	85
42	Gráfico de puntos para la longitud total de las larvas de <i>R. arenarum</i> criadas en agua de los sitios.	88

## **Recursos financieros para la realización de la tesis**

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

- 1) Beca Interna Doctoral Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- 2) Programa 18/C288, Programa 18/C350, Programa 18/C416 y Programa 18/C448: Evaluación y actualización de la diversidad de anfibios en el área central de Argentina, su conservación, manejo y transferencia educativa. Director: Dr. A. Martino Financiado por Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Resolución Rectoral n° 807/09; 852/11 y 161/16.
- 3) FONCyT-PICT (2012). Categoría: Temas Abiertos. Tipo de proyecto: Equipo de Trabajo. Tema: “Evaluación y actualización de la diversidad de anfibios del área central de Argentina, su diversidad, conservación e importancia práctica en salud humana”. Responsable: Dr. Adolfo L. Martino. Código: 2012-0932.
- 4) FONCyT-PICT (2014-2017). Categoría: Temas Abiertos. Tipo B: Investigador joven. Tema: “Efectos de la contaminación acústica sobre el canto de advertencia y el comportamiento reproductivo de los anfibios: sus implicancias prácticas en manejo y conservación”. Responsable: Dr. Pablo R. Grenat. Código: 2014-2533.

## **1 - INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Ecosistemas acuáticos

El agua al mismo tiempo que constituye el líquido más abundante en la tierra, representa el recurso natural más importante y la base de toda forma de vida. Por otra parte, regula la temperatura ambiental del planeta e interviene de alguna manera en la mayoría de las actividades humanas, tanto de explotación como de utilización de los recursos, convirtiéndose en un factor determinante para la organización del territorio (Margalef, 1983).

La contaminación ambiental ha adquirido carácter global, ya que las diversas actividades antropogénicas necesarias para los requerimientos que la sociedad demanda, son las principales causas de la disminución y modificación de los hábitats naturales, generando una serie de alteraciones ambientales (Blaustein *et al.*, 2011). Los sistemas acuáticos son uno de los más afectados ya que captan y acumulan finalmente todos los contaminantes naturales o artificiales, comúnmente denominados xenobióticos, los cuales provocan un deterioro del agua afectando directamente a la biota que se desarrolla en este sistema.

Los cuerpos de aguas lenticos, son los más susceptibles a la presencia de contaminantes debido a la ausencia de flujo, por lo tanto el proceso de eutrofización se intensifica en estos ambientes, provocando cambios físicos, químicos y biológicos en la calidad del agua (Esteves, 2011). Mientras que un ambiente lotico, presenta flujos energéticos y mecanismos de autorregulación lo que favorece la dispersión de los contaminantes, minimizando su acumulación dentro del sistema (Esteves, 2011). La dinámica de un sistema lotico, depende de las características físico-químicas del agua, influenciada directamente por la composición química del sustrato geológico sobre el cual circula, así como también de diferentes componentes de la cuenca como la vegetación ribereña, pendiente entre otras (Smith y Smith, 2001).

Las relaciones entre el medio acuático lotico y el medio terrestres son múltiples, y complejas, ya que estos sistemas son abiertos y dependen del suministro básico de energía de las áreas terrestres, que son las que aportan materia orgánica que llegan al agua a partir de la vegetación, son sistemas muy sensibles a las actividades humanas desarrolladas en la cuenca (Foguelman y Brailovsky, 1999).

La actividad minera es una actividad que genera alteraciones paisajísticas, biológicas, físicas y químicas ya que produce un sin número de componentes químicos (Welsh y Ollivier, 1998; Milu *et al.*, 2002; Owor *et al.*, 2007; Kelm *et al.*, 2009), los cuales repercuten directamente sobre los ecosistemas acuáticos, terrestres y aéreo (Correa *et al.*, 2000; El Khalil *et al.*, 2008). Bajo estas condiciones, la contaminación del agua puede afectar a las poblaciones de organismos asociados a estos sistemas, dependiendo del tipo y concentración del agente tóxico.

## **1.2. Ecotoxicología y Bioindicadores**

La Ecotoxicología surge como disciplina para responder a los problemas generados por la constante aplicación de contaminantes en el ecosistema. Fue definida por primera vez por Truhaut, (1977) como la rama de la toxicología que estudia los efectos tóxicos causados por los contaminantes naturales y sintéticos en los ecosistemas, intentando explicar las causas y prever los riesgos probables.

Durante años la contaminación acuática fue evaluada y monitoreada a través de determinaciones físico-químicas expresadas también como índices de contaminación y controladas con parámetros de referencia. Estos análisis son útiles para alertar sobre riesgos en la salud y el ambiente en base a concentraciones máximas permitidas. Sin embargo la información que genera es incompleta, porque no se consideran las interacciones bióticas y abióticas y las influencias sobre el ecosistema particular. Algunos autores consideran que el método biológico como prueba para evaluar calidad de agua, juega un papel importante en el manejo del recurso hídrico por ciertas ventajas, como su nivel integrativo y su bajo costo (Welsh y Ollivier, 1998).

Normalmente en los ecosistemas los organismos están expuestos a más de una sustancia al mismo tiempo, que se encuentran en bajas concentraciones en el ambiente, excepto en los episodios de contaminación como por ejemplo, derrames, aplicación inadecuada de pesticidas. Los efectos de los contaminantes se producen sobre los organismos individuales por toxicidad directa o alterando el ambiente, pero el significado ecológico, reside en el impacto sobre las poblaciones (Moriarty, 1984). En este contexto Moriarty (1999) considera a los contaminantes como factores, que puede intervenir en los parámetros poblacionales (tasa de natalidad y mortalidad), repercutiendo finalmente en la

dinámica de las mismas. Por esta razón, los estudios que combinan aspectos ecológicos y toxicológicos, como evaluaciones de la calidad del medio, complementados con análisis fisicoquímicos convencionales (Cajaraville, 1998), permiten tener una visión holística de los efectos de los ambientes alterados sobre las poblaciones naturales (Herkovits *et al.*, 1996).

Los ensayos biológicos de toxicidad, son herramientas de diagnóstico ambiental adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba, (Ossana, 2011). Los mismos pueden llevarse a cabo, bajo condiciones experimentales específicas y controladas en laboratorio, estudios *in vitro*, *in vivo*, *in vivo-in vitro* o a campo, *in situ* (Castillo Morales, 2004).

Para la evaluación de la carga tóxica que pueden soportar los ambientes acuáticos se han desarrollado protocolos estandarizados por organizaciones internacionales de regulación y control tales como: U.S. Environment Protection Agency, American Public Health Association, Comunidad Económica Europea y American Society for Testing and Materials. Pero desde hace unos años se está proponiendo el uso de **indicadores biológicos** como herramienta eficaz para el monitoreo ambiental. Muchos autores indican que los análisis químicos por si solos son una “fotografía instantánea” por lo tanto los efectos de los contaminantes solo se detectan si esta fotografía fue “tomada” en el momento exacto. Es decir, los resultados son puntuales en la dimensión cronológica y no revelan mucho de la evolución (disolución) de una carga contaminante y la capacidad resiliente y amortiguadora de los ecosistemas acuáticos (Sánchez Vélez y García Núñez, 1999).

Son muchas las especies que desde hace siglos se han identificado y utilizado para detectar la existencia de sustancias tóxicas, y consecuentemente inferir sobre la calidad y condiciones de un ambiente contaminado. A estas se les ha dado el nombre de **bioindicadores**. Los anfibios son considerados excelentes bioindicadores de la condición o estado de los hábitats terrestres o acuáticos (Lambert, 1997; Young *et al.*, 2004), principalmente por un conjunto de características propias del grupo, que los convierten en organismos sensibles a los cambios ambientales, tales como:

**a) Importancia trófica:** Debido a su ciclo de vida bifásico, los anfibios son componentes críticos de los ecosistemas. Son capaces de ocupar diversos nichos tróficos, desde planctívoros hasta carnívoros, cumpliendo un importante rol en la transferencia de

energía y nutrientes a través de las redes tróficas acuática y terrestre (Welsh y Ollivier, 1998; Manzanilla y Péfaur, 2000; Young *et al.*, 2004; Lascano *et al.*, 2009).

**b) Sensibilidad ambiental:** La documentada sensibilidad de los anfibios en todas sus fases de vida se debe principalmente a que sus huevos poseen una cubierta delgada y poco protectora y su piel permeable en los estadios terrestres, permitiendo el intercambio de materiales con el medio; su baja tasa metabólica; su pobre habilidad para la desintoxicación de biocidas absorbidos, inhalados o ingeridos con los alimentos y a la alta eficiencia de conversión y de bioacumulación comparada con otros animales de su misma posición trófica. Además, la alternancia de hábitats acuáticos y terrestres representa un doble riesgo, ya que cualquier tipo de contaminación en alguno de ellos podría afectar la supervivencia de las poblaciones (Cei, 1980; Duellman y Trueb, 1994; di Tada *et al.*, 1996; Young *et al.*, 2004; Autrom, 2010)

**c) Extinción inminente:** Durante los últimos años, numerosos estudios han coincidido que existe una declinación en las poblaciones de anfibios a nivel planetario. Esta extinción masiva representa la segunda más importante en biomasa después de la de los dinosaurios en el Cretácico (Stuart *et al.*, 2004). Las posibles causas que están afectando la supervivencia de los anfibios, son: la pérdida de hábitat, la contaminación ambiental, ciertas enfermedades específicas, la radiación UV y el cambio climático global (Stuart *et al.*, 2004; Beebee y Griffiths, 2005; Hopkins, 2007; Blaustein *et al.*, 2011; Peltzer *et al.*, 2011).

La salud del ambiente necesita de atención para permitir el equilibrio y la sostenibilidad de todos los elementos que lo conforman. De este modo, los estudios de genotoxicidad en poblaciones de anfibios que habitan ecosistemas alterados, resultan útiles para ahondar en la relación entre los organismos y su medio y con ello la salud del ambiente.

Dentro del ciclo de vida de los anfibios, la fase acuática, especialmente la embrionaria, es la más utilizada para los estudios de toxicidad, por reunir las características ideales en cuanto a sensibilidad, elevado número y alta homogeneidad de individuos. También, la facilidad y economía de la obtención del material y del mantenimiento, colaboran para que los estudios que utilizan embriones y larvas de anfibios se encuentren

dentro de los más frecuentes en toxicología ambiental (Herkovits *et al.*, 1996; Astrum, 2010).

En este contexto, resulta valioso el conocimiento sobre la ecología de larvas de anfibios, ya que los estadios larvales presentan un rol fundamental en la regulación de la fase adulta (Heyer, 1974; Wilbur, 1980).

El estudio de la dieta en larvas de anfibios podría resultar una herramienta muy útil para la caracterización y monitoreo de la calidad ambiental, ya que representa una medida general de la oferta y disponibilidad trófica de los distintos ambientes que ellas habitan, por lo que también es considerada la dieta como un indicador biológico de la calidad ambiental (Jüttner *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 2004; Díaz Quirós y Rivera Rondón 2004; Bionda *et al.*, 2012).

Por otro lado, además del rol que los estudios sobre la ecología trófica pueden tener sobre la calidad de un ambiente, las alteraciones de los ambientes acuáticos o el deterioro en la calidad de los mismos, puede alterar el crecimiento y desarrollo normal en las larvas de anfibios, aumentando la mortalidad, la depredación, así como también el tiempo y tamaño a la metamorfosis (Carey y Bryant 1995; Taylor *et al.*, 2005). El retardo en el crecimiento de algunas larvas de anuros en presencia de contaminantes ha llevado a preguntarse si éstos pueden intervenir con el aprovisionamiento óptimo del alimento, la digestión del mismo o la síntesis de nuevos tejidos.

### **1.3. Biomarcadores**

En los últimos años se ha observado que las pruebas de toxicidad, que sólo estudian los efectos inmediatos, no son suficientes en las evaluaciones de riesgo de los ecosistemas en su conjunto. Por ello, también se consideran importantes las evaluaciones de las alteraciones a largo plazo, es decir, subcrónicas y crónicas, que sirven de referencia para considerar la incidencia de estos cambios sobre la biodiversidad y la salud humana (Lajmanovich *et al.*, 1998). El uso y desarrollo de biomarcadores, indicativos de la exposición ambiental a xenobióticos, han cobrado un gran interés a la hora de evaluar el riesgo de una sustancia o mezcla de sustancias químicas potencialmente tóxicas pudiendo relacionar causa y efecto (Lajmanovich y Peltzer, 2008).

El término biomarcador fue definido por McCarthy y Shugart (1990), como medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales, provenientes de hábitats contaminados, así como también organismos expuestos experimentalmente a contaminantes que tienen la particularidad de indicar que han estado expuestos a sustancias tóxicas. Es decir, que las respuestas bioquímicas, fisiológicas, histológicas, morfológicas y comportamentales son considerados biomarcadores.

Podemos distinguir dos tipos de biomarcadores, los que indican exposición y aquellos que indican el daño producido por la exposición. Las medidas de los dos tipos de biomarcadores se llevan a cabo en los mismos individuos ya que, entre otras razones, facilita la demostración de relaciones causa/efecto y aumenta la capacidad de desarrollar modelos estadísticos que permitan predecir el grado de perturbación sufrido por el sistema. En general, es necesario utilizar una batería de biomarcadores, organizados de forma jerárquica y relacionada funcionalmente entre ellos. Es importante que el tiempo de respuesta del biomarcador sea corto (horas, días), de forma que éste pueda ser utilizado como "sistema de alarma temprano" y puedan tomarse medidas de reparación antes de que el ecosistema se vea afectado.

Las características que deben tener los biomarcadores son: reproducibilidad, sensibilidad, especificidad, reversibilidad, aplicabilidad en diversos taxones, facilidad de uso y relación costo/efectividad adecuado. Si además, el biomarcador muestra valor diagnóstico, este podrá ser entonces utilizado de forma predictiva (Cajaraville *et al.*, 2000; Maluszynska y Juchimiuk, 2005; Hurtado Alarcón *et al.*, 2007). En general los biomarcadores se clasifican en tres tipos:

- 1- *Biomarcador de Exposición*: es la medición de una sustancia exógena o su metabolito, o el producto de una interacción entre un xenobiótico y algunas moléculas o células blanco dentro de un organismo.
- 2- *Biomarcador de Susceptibilidad*: es la medición bioquímica, fisiológica, comportamental u otra alteración dentro de un organismo que, dependiendo de la magnitud, puede ser reconocido y asociado con una enfermedad o alteración en la salud.
- 3- *Biomarcador de Respuesta o Efecto*: indicador de una capacidad adquirida o inherente de un organismo para responder a cambios de exposición a un xenobiótico específico.

### 1.3.1. Biomarcadores Genotóxicos

Estos biomarcadores tienen como principal objetivo analizar el posible efecto ya sea *in vivo* como *in situ*, la posible acción de xenobióticos simples o sus mezclas, como potenciales mutágenos, utilizando pruebas biológicas que muestren el efecto subcelular provocado. De acuerdo al tipo de tejido, el daño puede ser reversible o irreversible, anticipando la posibilidad de procesos de reparación. Cuando esos mecanismos han sido alterados nos encontramos ante un ADN modificado (célula mutada) que puede conducir a una transformación celular, lo que a su vez, podría desencadenar un proceso de complejidad variable (carcinogénesis, teratogénesis, senescencia precoz, apoptosis) (Carballo y Mudry, 2006).

Los ensayos más utilizados para medir la respuesta mutagénica se encuentran el aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, biomarcadores enzimáticos, ensayo cometa y test de micronúcleos (Arkhipchuk y Garanko, 2005; Palma Acuña, 2005; Ramírez, 2006; Hurtado Alarcón *et al.*, 2007; Junín *et al.*, 2008; Klobučar *et al.*, 2010; Pollo *et al.*, 2012). Este último es un biomarcador de efecto que permite cuantificar el daño producido por agentes aneunógenos y/o clastógenos indistintamente (Mudry y Abrevaya, 2006).

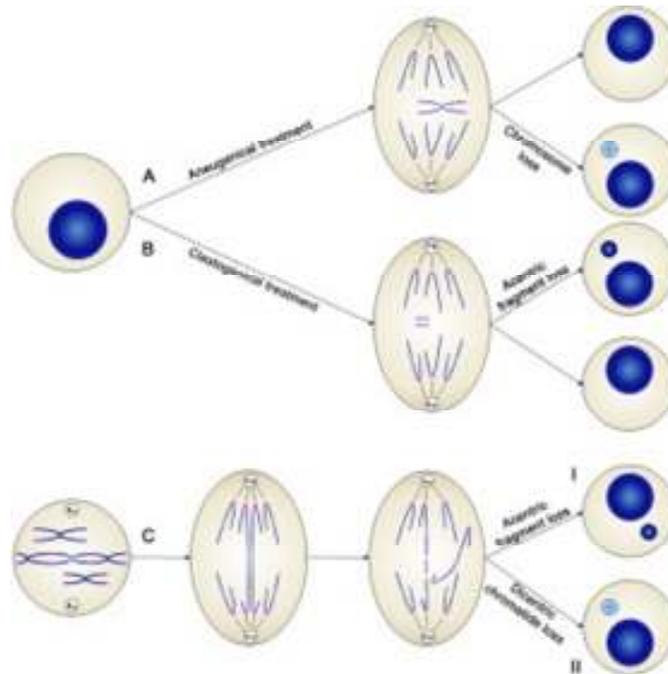
El test de micronúcleos, el cual se aplicó inicialmente en ratones, posteriormente fue modificado y adaptado a diferentes especies tanto en humanos (por ejemplo, Lucero *et al.*, 2000; Zalacain *et al.*, 2005), como en plantas y animales (Djomo *et al.*, 2000; Palma Acuña, 2005; Junín *et al.*, 2008; Arslan *et al.*, 2009; Pollo *et al.*, 2012), es una de las pruebas más populares en ecotoxicología, representando un indicador de daño en el ADN (Machado da Rocha, 2011); su simplicidad, sensibilidad y obtención de resultados inmediatos, hacen de este test, un método de fácil aplicación (Junín *et al.*, 2008). Además la sub-letalidad y detección de alteraciones tempranas conduce a acciones de prevención y/o remediación (Livingstone, 1993).

Durante el ciclo celular, pueden ocurrir errores durante la replicación y posterior división del ADN, haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo para cada célula con pérdida cromosómica. Dicho material queda excluido y no se incorpora en el núcleo de la célula hija forma un nuevo núcleo de menor tamaño denominado “micronúcleo” (MN) (Schmid, 1975; Brunetti *et al.*, 1988; Fenech, 2000; Phalhares y

Koppe Grisolia, 2002; Zalacain *et al.*, 2005; Udrouiu, 2006; Junín *et al.*, 2008) también conocido por los hematólogos como cuerpo de Howell-Jolly (Figura 1).

Schmid (1975) propuso mecanismos por los cuales se podría formar un micronúcleo en el citoplasma:

- A) En la anafase, una cromátida céntrica y fragmentos cromosomales rezagados con retraso cuando los elementos céntricos van hacia los polos del huso. Los micronúcleos se presentan de fragmentos cromosomales o cromosomas acéntricos que no son incorporados en el núcleo hijo en la mitosis porque carecen de centrómero.
- B) Los elementos rezagados pueden ser incluidos en el núcleo de las células hijas, pero una proporción de una o varios núcleos secundarios los cuales son mucho más pequeños que los núcleos principales (1/5 o 1/20), son llamados micronúcleos. Los que no pueden ser observados hasta después del primer ciclo celular.



**Figura 1.** Representación gráfica de los posibles caminos de formación de micronúcleos. A) Los agentes aneugénicos pueden causar MN formados por un cromosoma entero que no pudo migrar por el huso mitótico. B) Los agentes clastogénicos forman fragmentos acéntricos. C) Formación de un MN acéntrico o dicéntrico por la ruptura durante anafase de un puente.

Durante el test de micronúcleos, algunos autores han observado la presencia de otras anormalidades nucleares lo que sugiere que se deben tener en consideración. Estas anormalidades, estarían relacionadas con fallas en la división celular, procesos de muerte celular, y a la genotoxicidad y/o mutagenicidad de algunos xenobióticos, las cuales se relacionan con la amplificación del ADN en la fase S (da Silva Souza y Fontanetti, 2006; Gökalp Muranli y Güner, 2011). Debido a su mayor capacidad de respuesta, el ensayo anormalidades nucleares en eritrocitos representa una alternativa a la prueba MN para superar una posible falta de sensibilidad relacionada con la baja frecuencia MN en anfibios silvestres. Por lo tanto es utilizado como una respuesta apropiada para evaluar genotoxicidad (Guilherme *et al.*, 2007).

Los test de Micronúcleos (MN) y Anormalidades Nucleares en eritrocitos (ANE), son una alternativa al test de aberraciones cromosómicas, ya que reducen la dificultad a la hora de realizar el recuento, mejora la sensibilidad del ensayo, ya que solo se cuentan células que han completado una división nuclear, incrementa la potencia estadística al analizar miles de células en vez de cientos de ellas, sumado a que son accesibles tecnológicamente y de reducido costo (Zalacain *et al.*, 2005).

### **1.3.2. Biomarcadores morfológicos**

Los cambios morfológicos en los individuos pueden manifestarse en lesiones internas externas o patologías cuyos efectos pueden ser fácilmente cuantificables. El uso de índices morfométricos como el de condición corporal, que relaciona peso - largo es un parámetro muy utilizado como medida que da una estimación del estado nutricional de los individuos.

Estudios recientes sugieren que el número de anormalidades morfológicas ha aumentado en muchas poblaciones de anfibios (Blaustein *et al.*, 2011). La causa próxima de las deformidades en los individuos de las poblaciones de anfibios silvestres no está todavía muy clara y puede deberse a una multiplicidad de orígenes. Entre dichas causas podemos mencionar: la polución ambiental debido a distintas actividades antrópicas (Peltzer *et al.*, 2011; Bionda *et al.*, 2012), la presencia de depredadores acuáticos que actuarían durante la fase larval de los anfibios (Lannoo, 2008; Ballengée y Sessions, 2009;

Johnson y Bowerman, 2010), la presencia de parásitos (Johnson *et al.*, 2002; 2006) o la radiación ultravioleta (Ankley *et al.*, 2000; 2002).

Un registro de 0-5% de anormalidades morfológicas en una población podría ser considerada una tasa baja, por encima de este valor, la frecuencia de anormalidades se considera alta (Piha *et al.*, 2006; Johnson y Bowerman, 2010). A pesar de que la causa próxima de anormalidades morfológicas en la fauna silvestre es difícil de establecer, el aumento de la prevalencia de las mismas puede tener consecuencias para la salud humana (Ouellet *et al.*, 1997). Por lo tanto la frecuencia de las deformidades en anuros puede ser una herramienta económica para evaluar la salud del ecosistema.

#### ***1.4. Antecedentes***

La Provincia de Córdoba posee una rica historia minera que inicia hacia fines del siglo XIX, cuando comenzaron importantes explotaciones de minerales industriales, manteniéndose vigente de forma reducida hasta el presente. En la zona del Batolito Cerro Áspero (BCA), naturalmente rica en flúor, se encuentra una empresa privada que se dedica a la extracción de fluorita ( $\text{CaF}_2$ ) a cielo abierto. Estudios sobre la caracterización físico-química del agua superficial realizados en la zona, indican que el ión fluoruro se encuentra en concentraciones menores a 0,35 mg/l, para arroyos que corren en ambientes metamórficos, mientras que en arroyos que circulan por un ambiente granítico presentan una concentración media de 0,90 mg/l (Coniglio, 2006).

El flúor es uno de los elementos más abundantes en los ambientes, por su electronegatividad y reactividad (Camargo, 2003). Debido a estas características, en la naturaleza el flúor no se encuentra en su estado elemental sino como ion fluoruro ( $\text{F}^-$ ), originado principalmente por la intemperie de minerales fluorados inorgánicos como fluorapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ), fluorita ( $\text{CaF}_2$ ) y criolita ( $\text{Na}_3\text{AlF}_6$ ) (Rosso *et al.*, 2011). Este elemento, promueve el crecimiento y desarrollo de los seres humanos y animales. Sin embargo, en cantidades excesivas produce efectos tóxicos en humanos (Xiong *et al.*, 2007), animales y plantas (Camargo 2003; Cao *et al.*, 2013).

Muchos estudios de laboratorio informan toxicidad del fluoruro para algas, plantas acuáticas, invertebrados, peces y renacuajos de anfibios (Camargo 2003; Goh y Neff, 2003; Chai *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2013; Chai *et al.*, 2017). Sin embargo, estos estudios no

siempre generan información ecológicamente relevante, ya que las situaciones de campo pueden no ser simuladas con precisión en el laboratorio y la recolección, almacenamiento o manipulación de la muestra puede afectar la toxicidad de la muestra (Castro *et al.*, 2003). Por lo tanto, se considera necesario realizar un relevamiento y monitoreo *in situ* de las poblaciones locales de anfibios que habitan sistemas ricos en flúor. Estos estudios son una herramienta eficaz ya que proporcionan un enfoque más realista, además, contemplan fenómenos ambientales como la biodisponibilidad o bioacumulación de compuestos presentes en el medio ambiente y permiten la interacción de múltiples factores que no se incluyen en las pruebas de laboratorio (Djomo *et al.*, 2000, Castro *et al.*, 2003, Antunes *et al.*, 2008, Lavoie *et al.*, 2012).

En el área de estudio la comunidad de anfibios anuros está integrada por: *Odontophrynus cordobae*, *O. occidentalis*, *Leptodactylus latinasus*, *L. gracilis*, *L. latrans*, *Melanophryniscus stelzneri*, *Rhinella arenarum* e *Hypsiboas cordobae* (di Tada, 1999). Para nuestro estudio se seleccionaron a las especies *R. arenarum* e *H. cordobae*.

*R. arenarum* es una especie abundante de fácil captura, presenta distribución neotropical (Frost, 2014) y se la ha utilizado en numerosos estudios ecológicos, fisiológicos, anatómicos y toxicológicos (Cabagna *et al.*, 2005; Brodeur *et al.*, 2008; Lajmanovich *et al.*, 2010; Bionda *et al.*, 2011; 2012; Caraffa *et al.*, 2013). Mientras que, *H. cordobae* tiene una distribución restringida a las sierras altas de las provincias de Córdoba y San Luis, esta distribución presenta además un amplio rango altitudinal (Baraquet *et al.*, 2013; 2014). Según lo reportado por la UICN (2014), como especie con datos insuficientes sobre su estado poblacional y requerimientos ecológicos se la considera interesante para el estudio.

## **2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS**

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

Las redes hídricas con altas concentraciones de flúor inducen cambios en los parámetros funcionales morfológicos y genéticos representando un riesgo para las poblaciones de anfibios anuros que habitan esos ambientes. Dichos parámetros componen una batería de biomarcadores e indicadores biológicos de estrés ambiental que muestran el riesgo ecológico al que podrían estar expuestos los anfibios anuros.

### 2.2. Objetivo general

Evaluar *in situ* los efectos de las altas concentraciones de flúor natural y artificial en dos especies de anfibios anuros *Rhinella arenarum* e *Hypsiboas cordobae*, aplicando una serie de biomarcadores de estrés ambiental.

#### 2.2.1. Objetivos específicos

- Describir la calidad de las redes hídricas asociadas a la actividad minera, a través de parámetros químicos y físicos entre los diferentes ambientes acuáticos estudiados.

#### Adultos

- Analizar y describir la presencia, tipo y frecuencia de anomalías morfológicas en anfibios adultos en los distintos sitios de muestreo.
- Comprobar la existencia de alteraciones citogenotóxicas utilizando biomarcadores (Test de micronúcleos y anomalías nucleares) en eritrocitos de *Rhinella arenarum* e *Hypsiboas cordobae*.
- Determinar y evaluar el grado e intensidad de parásitos intra y extracelulares de las especies estudiadas.

## Larvas

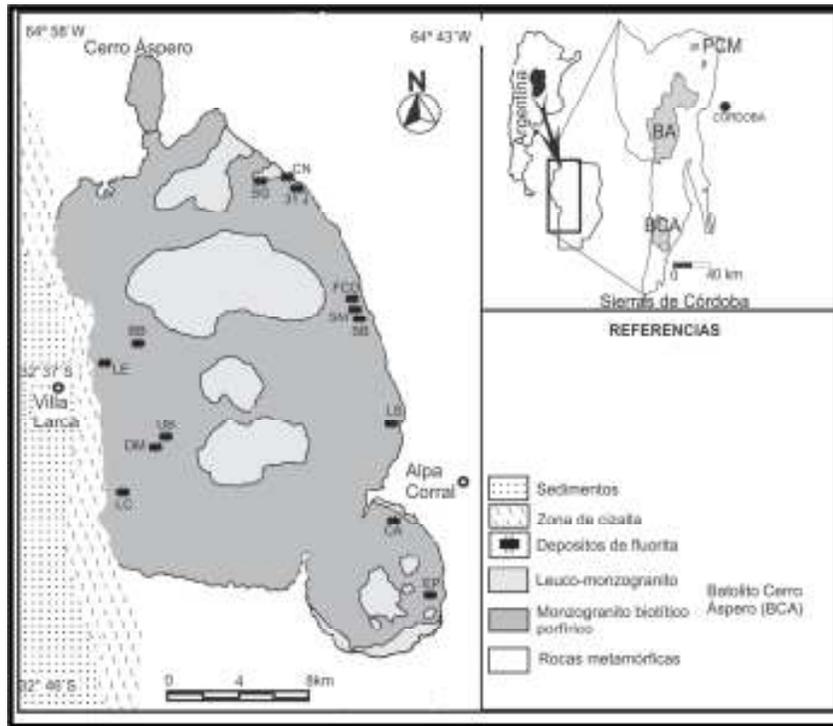
- Explorar los posibles efectos de ambientes con altas concentraciones de flúor (F-) sobre la dieta, morfología (longitud total) y condición corporal de larvas de *Rhinella arenarum* e *Hypsiboas cordobae*.
- Analizar y describir la presencia, tipo y frecuencia de anomalías morfológicas en larvas de anfibios en los distintos sitios de muestreo.
- Comprobar la existencia de alteraciones citogenotóxicas utilizando biomarcadores (Test de micronúcleos y anomalías nucleares) en eritrocitos de *Rhinella arenarum* e *Hypsiboas cordobae*
- Evaluar el efecto sobre la supervivencia y longitud total de la calidad del agua superficial de los sitios a través de bioensayos de laboratorio con larvas de *R. arenarum*

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Descripción del Área

La provincia de Córdoba presenta importantes yacimientos que se agrupan en tres distritos: Cabalango, Sierra de Comechingones y Guasapampa. El área estudiada se encuentra en la Provincia Geológica Sierras Pampeanas de Córdoba y San Luis, dentro del distrito Sierra de Comechingones, específicamente en la región centro-sur de la sierra de Comechingones. Este distrito agrupa manifestaciones y yacimientos de fluorita emplazadas en el batolito de Cerro Áspero-Alpa Corral, un complejo granítico de 440 km<sup>2</sup> de extensión, de forma elipsoidal, ubicado en el departamento Calamuchita (Figura 2). Los yacimientos y minas se dividen en cuatro grupos: Grupo Los Cerros Negros, Grupo Bubú, Grupo Francisco y Grupo Alpa Corral.



**Figura 2.** Geología del batolito Cerro Áspero (BCA) y ubicación de los principales depósitos de fluorita. Abreviaturas: Bubú (BB); La Estela (LE); Ubaldina (UB); Don Miguel (DM); La Cabecita (LC); El Pantanillo (EP); Carlos (CA); La Saida (LS); San Basilio (SB); Santa María (SM); Francisco (FCO); San Guillermo (SG); 31 de Julio de 1896 (31J); Cerros Negros (CN). Granitos devónicos: Batolito Cerro Áspero (BCA); Batolito de Achala (BA); Plutón Capilla del Monte (PCM). Figura tomada de Coniglio *et al.*, 2006.

El Grupo Los Cerros Negros está localizado sobre el faldeo oriental de la Sierra de Comechingones, en el extremo sureste del distrito minero Cerro Áspero, a unos 40 km en línea recta al oeste de Berrotaran. De acuerdo a Coniglio *et al.*, (2006) el batolito Cerro Áspero contiene en promedio 1,210 mg/Kg de F-, que es dos veces más elevado que el de la roca metamórfica encajante y que el de otros granitos no mineralizados de las sierras de Córdoba. Esta formación natural permitió la instalación de varias minas de extracción de flúor, Los Cerros Negros, 31 de Julio de 1896, San Guillermo, San Cayetano y Patricia. Estas minas han tenido diferentes ciclos de explotación, pasando por períodos de inactividad. En la actualidad la mina Los Cerros Negros es la única que se encuentra en producción desde 1991 (Coniglio, 2006), ocupa aproximadamente una superficie de 1 km<sup>2</sup> a una altitud de 1200 metros sobre el nivel del mar.

### **3.1.2 Caracterización de la zona de estudio:**

#### *\*Clima*

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

#### *\*Vegetación*

Según la descripción fitogeográfica de Cabrera (1994) la zona de estudio pertenece al distrito Chaqueño Serrano. La vegetación dominante es el bosque xerófilo, alternado con estepas de gramíneas duras distribuyéndose en pisos escalonados según la altura. Esto, se puede observar a medida que avanzamos desde la localidad de Río de los Sauces hasta llegar al yacimiento, donde el bosque que se extiende desde los 700 hasta los 1100 m.s.n.m. presenta diferentes unidades de vegetación: Bosque de molles (*Lithrea molleoides* (Vell.) Engl.), Bosque de cocos (*Zanthoxylum coco* Gillies ex Hook. f. & Arn.), Bosque de espinillos con carquejilla (*Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger var. *dehiscens* Burkart ex Ciald -*Baccharis articulata* (Lam.) Pers) y Bosque de espinillos con tala (*Vachellia caven*-*Celtis ehrebergiana* (Klotzsch) Liebm.). A esta unidad le sigue la

Estepa arbustiva que se ubica en zonas rocosas de manera dispersa desde los 800 hasta los 950 m.s.n.m.; florísticamente es muy heterogénea, pero generalmente se encuentra constituida por grupo de especies de alta constancia, entre las cuales encontramos *Heterothalamus alienus* (Spreng.) Kuntze (romerillo), *Acanthostyles buniifolius* (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob., *Baccharis articulata* (Lam.) Pers (carquejilla) y *Schizachyrium condensatum* (Kunth) Nees (Oggero y Arana, 2012).

#### *\*Litología*

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

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

La unidad granítica está conformada por bloques de rocas que presentan un aspecto suave, redondeado, con morfologías típicas de la meteorización del granito en climas templados como son los taffonis y bochones (Andreazini, 2002). Mientras que la unidad metamórfica se localiza al Este de la zona de estudio y está formada por rocas metamórficas, milonitas y anfibolitas, éstas últimas localizadas en los alrededores del arroyo Los Vallecitos. Se caracteriza por una morfología escarpada, con crestas rocosas elongadas en dirección N-S, de acuerdo a la foliación regional de las rocas (Andreazini, 2002).

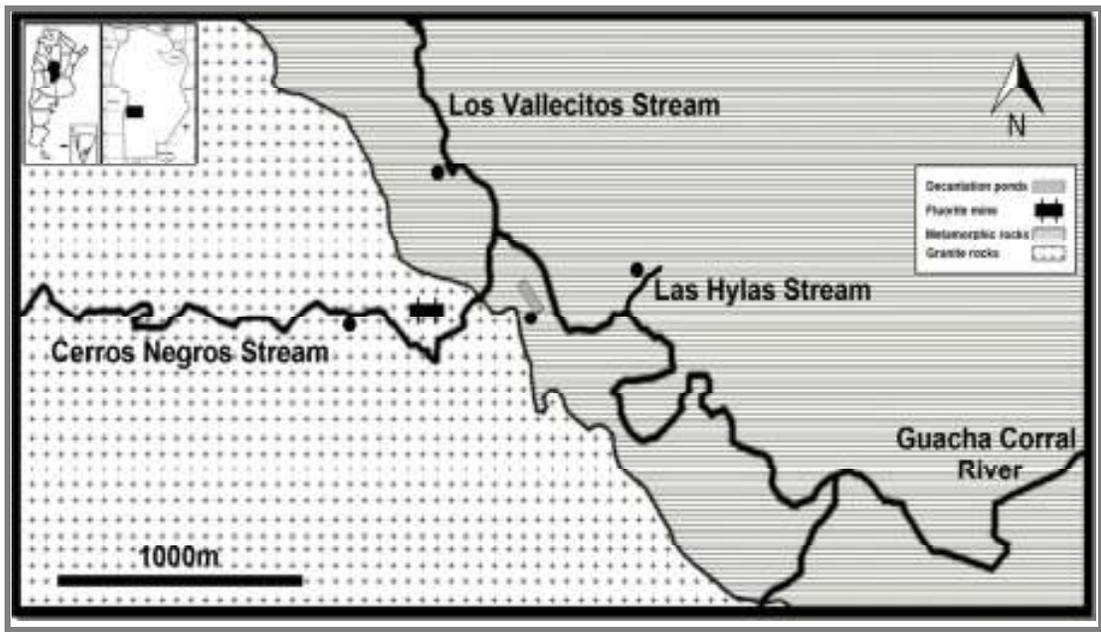
#### *\*Hidrología Superficial*

El área de estudio comprende arroyos de la cuenca imbrífera superior del río Ctlamochita (Tercero) perteneciente a la subcuenca Carcarañá. Esta subcuenca está formada por arroyos que nacen entre los 800 y los 1500 m s.n.m. en la falda oriental de las Sierras de los Comechingones en la provincia de Córdoba (Argentina). Los ríos y arroyos

serranos de esta región presentan lechos rocosos, erosivos, con abundantes saltos, rápidos y ollas. Los cursos de agua se caracterizan por un régimen de tipo torrencial, donde en épocas de caudal pico se suma gran cantidad de sedimentos de granulometría variada (Cabido *et al.*, 2003).

En cuanto a la hidrología superficial, podemos identificar, la cuenca del arroyo Los Cerros Negros con una superficie de 10 Km<sup>2</sup> circulando sobre roca granítica de oeste a este, al llegar a la zona de las instalaciones de la planta de procesamiento de fluorita, este recibe al arroyo Los Vallecitos de unos 3,5 Km<sup>2</sup> el que nace y discurre por roca metamórfica al igual que un sin número de pequeños arroyos, para volcar finalmente sus aguas en el río Guacha Corral, el curso más importante de la zona, el cual desemboca en el río Quillín, terminando finalmente en el embalse del río Tercero (Figura 3).

Los arroyos seleccionados para este estudio corresponden a arroyos de cabecera que a escala de tramo (aproximadamente 10m) se encuentra caracterizada por presentar una combinación de unidades de menor escala, microhábitat (aproximadamente 1m) donde encontramos rabiones y pozones. Estas unidades funcionales difieren en velocidad de corriente, profundidad y tipo de sustrato.



**Figura 3.** Localización de las principales redes hídricas de la zona de estudio. La sección punteada corresponde a roca granítica mientras que la sección con líneas a la roca metamórfica. Los círculos negros indican los puntos de muestreo.

*\*Economía regional*

En la zona se destaca la actividad ganadera, con ganado ovino y bovino, y algunos campos están destinados para la actividad forestal con especies exóticas principalmente del género *Pinus* sp favorecidos por el clima y el suelo de la zona ya que estos presentan un escaso desarrollo. La zona de estudio presenta escasa carga ganadera siendo la actividad minera la una actividad predominante.

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

La extracción se realiza a cielo abierto desde el año 2004, pero con anterioridad se practicó de forma subterránea por el método de realce. La mina Los Cerros Negros posee una planta de tratamiento mineral que incluye el sector de trituración primaria y secundaria con capacidad de tratamiento de 1.500 toneladas mensuales (*comunic per* Martínez J. M). El proceso de flotación permite producir fluorita de grados ácido (97 % de  $F_2Ca$ ), cerámico (95 % de  $F_2Ca$ ) y metalúrgico (85 % de  $F_2Ca$ ) (Bonalumi *et al.*, 2014).

El predio del yacimiento se encuentra ocupando aproximadamente 1 Km<sup>2</sup>, donde se pueden observar la planta de flotación, trituración, galpones de acopio, oficinas y dormitorios, etc. Además, en el predio se pueden observar 6 piletas de tierra sobre elevadas donde decantan los efluentes que resultan del proceso (Figura 4).



**Figura 4.** Instalaciones del emprendimiento minero Fluorita Córdoba. Foto google earth.

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

El proceso consiste primero en una tritución de la fluorita ingresando a la planta de flotación con un tamaño inferior a los 12 mm, (Figura 5) luego se le adiciona soda caustica para elevar el pH a 9 y silicato de sodio para generar una burbuja alrededor de la fluorita. Posteriormente, se pasa a un molino y luego a una centrifuga para lograr una granulometría de 0,15 mm. A la mezcla que se genera al principio del proceso (fluorita + soda caustica + silicato de sodio) se le agrega ácido oleico, un ácido orgánico graso, que permite la flotación. El material flotado se va retirando por canaletas y el resto se dirige a las piletas de decantación (Figura 6). Luego dicho material va pasando por una serie de celdas donde va cambiando de color grisáceo a violeta. En las últimas celdas se le agrega nuevamente silicato de sodio para lograr un pH entre 7,5 y 8 (*comunic per* Martínez J. M).



**Figura 5.** Planta de tritución de la fluorita llevada a un tamaño menor de 12 milímetros. Foto Adolfo Martino

Por otra parte el material ya concentrado se le adiciona ácido acético (8 a 10%) cuya función es disminuir el pH a 5 para acelerar su decantación. Una vez logrado el paso anterior, el material pasa a un filtro a vacío (tambor giratorio) donde la fluorita con un aspecto de talco liliáceo con escasa humedad (Figura 7 A), termina de secarse por medio de un horno (Figura 7 B). Finalmente la fluorita es almacenada en silos (Figura 7 C) (*comunic per* Martínez J. M).

Los efluentes que se generan durante el proceso son dirigidos hacia las piletas de decantación. Estos efluentes contienen elevados contenidos de F- ya que el proceso no es el 100% efectivo.



**Figura 6.** Proceso de flotación de la fluorita mediante el uso de aceites orgánicos. Foto Adolfo Martino



**Figura 7.** Proceso de secado de la Florita. A) Filtro de vacío, B) Horno de secado de la fluorita, C) Cilos de almacenamiento y d) bolsones de fluorita fluotada lista para comercializar.

Foto Adolfo Martino

### 3.1.3. Sitios de muestreo

Para la elección de los sitios de muestreo, se consideró al agua superficial como el de mayor interés a evaluar, debido a que el emprendimiento minero se ubica en los alrededores de la unión de los dos arroyos más importantes de la cuenca, el arroyo Los Cerros Negros, Los Vallecitos y sus respectivos efluentes. Además, el agua de estas redes hídricas es utilizada para el funcionamiento de la planta de tratamiento que incluye la trituración primaria, secundaria y el proceso de flotación. Otro sitio muy interesante a evaluar son las Piletas de decantación, un ambiente artificial utilizado por el emprendimiento donde se depositan los materiales producto del proceso, ya que es un sitio utilizado por los anfibios para reproducirse.

Los sitios relevados en este estudio son:

- I) Arroyo Las Hylas (A°H) (Figura 8) denominado así por no tener nominación previa. Para la elección de este sitio se tuvo en cuenta que el arroyo no tuviera conexión con el A° Los Cerros Negros. Este arroyo, Las Hylas, se encuentra fuera del campamento, circula por roca metamórfica, es un arroyo de primer orden con escasa velocidad de corriente, muy estrecho, con algunos pozones, la mayor parte de su caudal se encuentra totalmente vegetado con *Hydrocotyle* sp y en sus márgenes podemos observar algunas cortaderas que alcanzan alrededor de 1 metro de altura.
  
- II) Arroyo Los Vallecitos (A°V) que nace y discurre por roca metamórfica (Figura 9). Es uno de los arroyos más importantes de la zona. Este presenta un caudal mayor que el arroyo antes mencionado ya que es de orden mayor, desembocándole sobre él un sin número de arroyos, todos circulando sobre roca metamórfica. En cuanto a su fisonomía este tiene escasa vegetación en su lecho, presenta rápidos y pozones con barrancas de hasta 1,5 metros de altura y en su ribera podemos encontrar pasto de altura y algunas cortaderas.

- III) Arroyo Cerros Negros antes del emprendimiento minero (A° CNa) (Figura 10), el cual circula de oeste a este por roca granítica. Es uno de los arroyos de mayor caudal, presenta rápidos y pozones y su lecho es totalmente de arena y roca madre, no permitiendo el desarrollo de vegetación. Presenta barrancas de más de 3 metros de roca madre, y en su ribera podemos observar gran cantidad de cortaderas.
  
- IV) Arroyo Cerros Negro mina (A° CNm) que circula sobre roca granítica. Las observaciones fueron realizadas después de atravesar la planta de molienda cerca del campamento minero (Figura 11). En este tramo, el arroyo presenta escasa velocidad de corriente, en su lecho podemos observar roca madre y abundante arena sin vegetación. Su ribera presenta barrancas de hasta 4 metros, con vegetación pequeña, algunas cortaderas y árboles de gran porte como por ejemplo el sauce criollo (*Salix sp.*).
  
- V) Piletas de decantación (PD), (Figura 12). Los piletos son presas artificiales de tierra sobre elevadas unos 3 metros próximos al arroyo Los Cerros Negros y tienen un tamaño aproximado de 15 metros por 25 metros cada una. Las 6 piletas se encuentran conectadas entre sí, donde el agua por desnivel termina en un tanque de tipo australiano el cual posee una bomba que hace re-circular el agua de nuevo a la planta aprovechando aproximadamente el 80% de esa agua. Las últimas 3 piletas se encuentran vegetada con juncos (*Typha sp.*).



**Figura 8.** Arroyo Las Hylas.  
Foto Favio Pollo



**Figura 9.** Arroyo Los Vallecitos.  
Foto Favio Pollo



**Figura 10.** Arroyo Los Cerros Negros antes de la mina. Foto Favio Pollo



**Figura 11.** Arroyo Los Cerros Negros en la mina. Foto Favio Pollo



**Figura 12.** Piletas de decantación vegetadas  
Foto Favio Pollo

### 3.2. Descripción de las especies en estudio

#### 3.2.1 *Rhinella arenarum*

##### 3.2.1.1. *Sistemática*

La nomenclatura utilizada en la clasificación de la especie fue tomada de Frost (2015).

Orden: ANURA

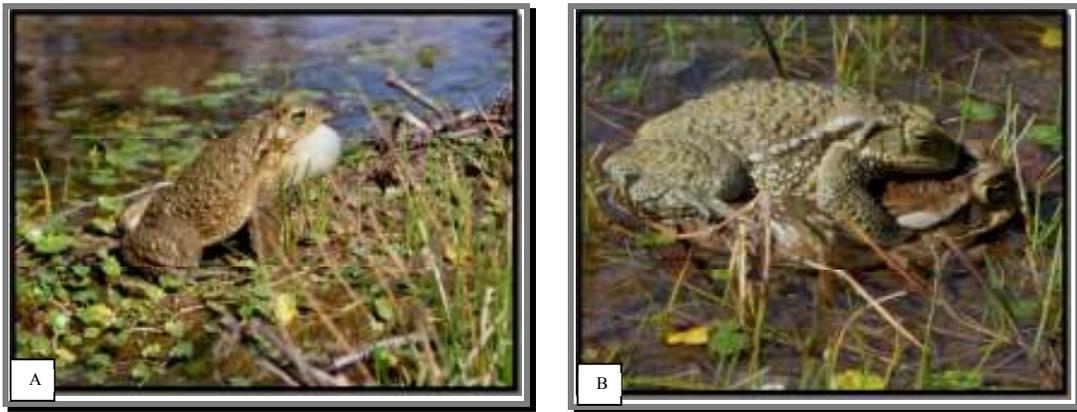
Familia: Bufonidae

Género: *Rhinella*

Espécie: *R. arenarum* Hensel, 1867

Nombre Vulgar: sapo común (Figura 13)

##### 3.2.1.2. *Características generales*



**Figura 13.** A) Ejemplar macho de *R. arenarum* y B) Pareja en amplexo. Sitio Las Piletas de decantación. Fotos Favio Pollo

**Descripción:** El sapo común presenta un tamaño mediano a grande (80 a 120 mm), siendo las hembras de mayor tamaño que los machos. La cabeza es levemente cóncava con el hocico redondeado con crestas cefálicas y ojos prominentes. Presentan un tímpano visible y redondo, una cresta a lo largo del labio superior y glándulas parotoides alargadas, seguidas por glándulas verrugosas. El macho tiene patas delanteras robustas, saco vocal externo azulado y callosidades nupciales en los dedos 1, 2 y 3 de la mano. La coloración dorsal del macho es parda o verdosa, mientras que la hembra grisácea o parda brillante, con grandes manchas pardas o verde oscuro. El vientre es blancuzco.

La larva presenta el extremo de la cola redondeado y la aleta no se extiende sobre el dorso. Es de color negro y se la puede encontrar en ríos, arroyos, lagunas y charcas temporarias (Ceí, 1980; Gallardo, 1987).

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

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

### 3.2.2. *Hypsiboas cordobae*

#### 3.2.2.1. *Sistemática*

La nomenclatura utilizada en la clasificación de la especie fue tomada de Frost (2015)

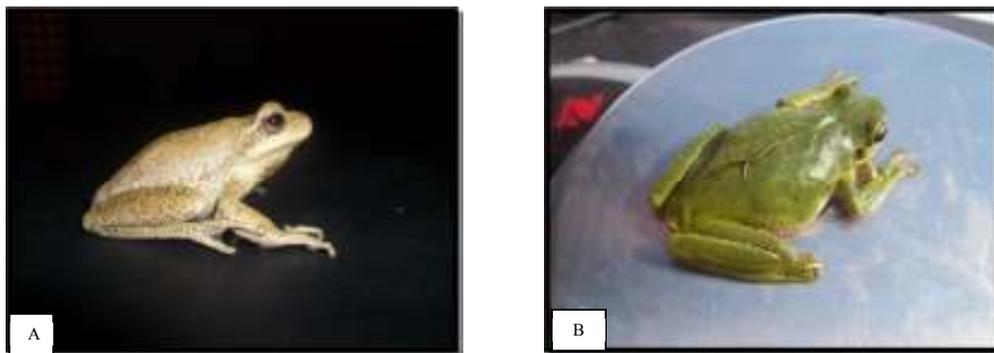
Orden: ANURA

Familia: Hylidae

Género: *Hypsiboas*

Espécie: *H. cordobae* Barrio, 1965

Nombre Vulgar: Ranita trepadora (Figura 14)



**Figura 14.** A) Macho de *H. cordobae*, B) Hembra de *H. cordobae*. Arroyo Las Hylas.

Fotos Favio Pollo

#### 3.2.2.2. *Características generales*

**Descripción:** El adulto de *H. cordobae* es de tamaño mediano (45-65 mm) con un pliegue timpánico acentuado. Presentan una gran variedad en cuanto a los patrones de coloración según su localización en la provincia, el dorso puede variar desde pardo canela al verde, liso o con un manchado dorsal reticulado con otras manchas, las bandas laterales están ausentes tanto en los flancos como en las extremidades.

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

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

**Distribución:** Se distribuye en las sierras altas de Córdoba y San Luis, desconociéndose con precisión los límites de su área, sobre todo en la zona de contacto con *H. pulchellus* (Barrio, 1965; Ceí, 1980; Gallardo, 1987; Baraquet, 2012)

### 3.3. Procedimientos de campo

En el campo cada sitio fue geo-referenciado con GPS Garmin Etrex 10. Se realizaron mediciones de variables hidráulicas como profundidad del cauce, ancho del cauce y velocidad de corriente siguiendo las recomendaciones de Corigliano, (2008). Además, se caracterizaron los márgenes de los cursos de agua de acuerdo a la pendiente y altura de las barrancas y terrazas de inundación. En cuanto a la vegetación de cada sitio, se determinó el porcentaje de cobertura del suelo, la estructura de dicha cobertura y la altura aproximada de la vegetación, según Gualdoni *et al.*, (1994) y Corigliano, (2008). En el recorrido de los sitios se determinó de manera visual la presencia de especies animales exóticas y las actividades antrópicas desarrolladas.

*In situ* se registraron las variables ambientales: temperatura del aire (a 100 cm del suelo) y del agua, pH, conductividad (C), salinidad (S) y solutos totales disueltos (SDT) con equipo digital 35-Series TestTM Multiparámetro 35425-10. El oxígeno disuelto en cada sitio fue medido con oxímetro digital Trans Instruments HD3030. Las precipitaciones mensuales fueron provistas por la empresa Fluorita Córdoba quien cuenta con una estación meteorológica en el campamento minero.

De cada sitio se tomaron muestras de agua, según los lineamientos sugeridos por APHA AWWA, (2010). Se recolectaron a profundidad media teniendo precaución de no poner en suspensión los depósitos sedimentados, utilizando recipientes de plástico de 1L. Las muestras fueron transportadas al laboratorio y conservadas en heladera hasta su

análisis físico-químico de cationes y aniones. Las mediciones se realizaron en el laboratorio del departamento de Geología, Área de Hidrología de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Para analizar la comunidad de algas presentes en cada uno de los sitios, se colocaron en recipientes plásticos, 3 réplicas de vegetación, guijarros y sedimento del fondo de los arroyos y de las Piletas de decantación, los cuales se conservaron en heladera hasta la identificación de la comunidad de perifiton bajo microscopio óptico. El reconocimiento y análisis de los diferentes taxones fue realizado por el área de botánica del departamento de Ciencias Naturales. De los sitios de muestreo propuestos, solo se recolectaron larvas pertenecientes a *R. arenarum* en las Piletas de decantación, ya que en los demás sitios solo se registró la presencia de adultos, mientras que las larvas de *H. cordobae* se capturaron en: arroyo Los Cerros Negro antes de la mina, Piletas de decantación, A° Los Vallecitos y A° Las Hylas.

Los muestreos se realizaron de manera sistemática con una frecuencia de aproximadamente dos o tres veces por mes desde el inicio de la actividad de *R. arenarum* (septiembre) hasta el cese de la actividad de *H. cordobae* (abril). Para los muestreos se utilizó la metodología de Relevamientos por Encuentros Visuales (Heyer *et al.*, 1994), que consiste en recorrer los bordes de los cuerpos de agua para la observación de amplexos, ovoposiciones; captura de larvas, metamorfoseados y adultos. Una vez capturados los individuos, se les determinó: clase de edad (recién metamorfoseado, juvenil o adulto), sexo según los caracteres sexuales secundarios (saco vocal, almohadillas nupciales y vocalización), peso, determinado con balanza semianalítica OHAUS GT 200-S (0,01g de precisión) y la longitud total (largo desde el rostro hasta la cloaca), utilizando un calibre manual Vernier SometInox Extra (0,01 mm precisión). Posteriormente después de su captura, se le extrajo una muestra de sangre por punción de la vena angularis de acuerdo a la metodología de Nöller (1959) para evitar efectos del estrés y fueron liberados en su sitio. Además cada individuo fue marcado con el corte de una de las falanges para corroborar independencia de los sitios y cuantificar los recapturados.

Alrededor de 20 larvas se colectaron por medio de una red de mano en cada sitio, 10 se transportaron al laboratorio para extracción de sangre y las 10 restantes entre los estadios 36-39 de Gosner (1960), fueron eutanizadas por inmersión en una solución de 0,1 % triclaína metanosulfonato (MS-222) (Peltzer *et al.*, 2013) en el campo y se conservaron

inmediatamente con formaldehído al 10 % (Heyer *et al.*, 1994) para el posterior análisis del contenido intestinal en el laboratorio de botánica del departamento de Ciencias Naturales.

### 3.4 Biomarcadores morfológicos

#### 3.4.1 Condición Corporal (CC)

A partir de largo total y peso de los individuos capturados se calculó la condición corporal (Bagenal y Tesch, 1978; Peltzer *et al.*, 2010) como medida que da una estimación del estado nutricional de los individuos.

$$CC = 100 \times [\text{peso corporal (g)}] / [\text{longitud (cm)}]^3$$

Las larvas fueron agrupadas en cuatro grupos principales siguiendo la tabla de Gosner (1960) para el análisis de los datos, por no tener todos los estadios representados:

- Grupo 1: desde el estadio 25 al 30
- Grupo 2: desde el estadio 31 al 35
- Grupo 3: desde el estadio 36 al 39
- Grupo 4: desde el estadio 40 al 46

#### 3.4.2 Anormalidades

Durante los periodos de muestreo los individuos capturados que presentaban algún tipo de anormalidad fueron transportados al laboratorio. Posteriormente, fueron fotografiados con cámara digital. A los adultos además, se les realizó una placa radiográfica con equipo marca Vetter REMS en el área de clínica animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. El tiempo de exposición de los individuos fue entre 0,01 y 0,05 segundos, con una potencia aproximada de 100 mA (MiliAmperios), 40-50 KV (kilovoltios) a una distancia de 80 cm. Para la clasificación de las anormalidades morfológicas observadas en adultos se siguieron a Lannoo (2008) y Peltzer *et al.*, (2011).

Las variaciones en los fenotipos de las larvas fue realizada con lupa binocular Zeiss West Germany, siguiendo la clasificación realizada por Ruiz *et al.*, (2010) y Peltzer *et al.*, (2013).

Se calculó el porcentaje de individuos con anormalidades por sitio y de forma similar, se calculó el porcentaje relativo de los individuos con anomalías por sitio muestreado y la frecuencia de cada tipo de anormalidad en relación al total de individuos capturados. Diferencias de proporciones de cada tipo de anormalidad para cada sitio fueron calculadas de a pares con el Test Binomial, utilizando InfoStat (Di Renzo *et al.*, 2012).

### **3.5 Procedimiento de Laboratorio**

#### ***3.5.1 Análisis químico de laboratorio***

Los análisis se realizaron de acuerdo con los métodos estándar de APHA AWWA, (2010). Los carbonatos y bicarbonatos se midieron por valoración potenciométrica con electrodo Thermo Orion-selectiva; sulfatos se midieron por turbidimetría (con Microtronic centrífuga); cloruro se midió por valoración colorimétrica con nitrato de plata; calcio y magnesio se midieron por valoración colorimétrica con EDTA; sodio y potasio se midieron por fotometría de llama (315 Metrolab fotómetro digital); y fluoruro por medio de electrodo selectivo de iones (Orion - Thermo). Los nitratos se determinan por potenciometría con electrodo selectivo de iones (Orion Modelo 9307) utilizando electrodo de referencia y Orion potenciómetro 710 A. Todas las mediciones se realizaron con un error analítico de 0,5%.

#### ***3.5.2 Variables ambientales***

De las variables medidas *in situ*, la conductividad es una variable que depende de la temperatura, por lo tanto para poder compararla en los diferentes sitios, se le aplicó un factor de corrección según la siguiente fórmula:

$$C_{\text{esp}20^{\circ}} = C_{t^{\circ}} \cdot f$$

donde  $C_t$  es igual a la conductividad a la temperatura ambiente y  $f$  = factor de corrección (valor de tabla).

Posteriormente a todas las variables se le calcularon medias, desvíos, máximos y mínimos. Se probó la normalidad (test de Shapiro-Wilks) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). La temperatura del agua, pH y oxígeno disuelto se compararon mediante un solo sentido ANOVA por cumplir con los supuestos del análisis paramétrico. Conductividad, salinidad y sólidos disueltos totales se compararon entre sitios utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, debido a que estas variables no cumplían los supuestos del ANOVA. Además, se realizó una prueba a posteriori DGC (Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves) comparando de a pares los sitios y un análisis de componentes principales (ACP) para representar de manera gráfica el agrupamiento de las variables de acuerdo a los sitios. Todos los análisis fueron realizados utilizando InfoStat (Di Renzo *et al.*, 2012).

### **3.5.3 Obtención de sangre**

Para obtener la muestra de sangre, las larvas fueron anestesiadas durante 15-20 minutos con una solución 2% de Cloretano (1,1,1-Trichloro-2-methyl-2-propanol hemihydrate Sigma-Aldrich™), posteriormente bajo una lupa, se realizó una incisión a nivel torácico para extraer el corazón, que se deslizó sobre un portaobjeto limpio y previamente codificado los cuales fueron teñidos con May Grunwald-Giemsa (Dacie y Lewis, 1995). El mismo procedimiento de tinción se aplicó para los extendidos de adultos.

#### *Método May Grunwald-Giemsa*

- \* Se cubrió los frotis con 1,5 mL de colorante May-Grünwald y se dejó actuar durante 3 minutos, respetando cuidadosamente ese tiempo.
- \* Se agregó sobre el frotis cubierto de May-Grünwald, 1,5 mL de agua estabilizada o destilada y se mezcló cuidadosamente mediante un movimiento de vaivén del portaobjetos, durante un minuto.
- \* Tirando el excedente sobre los portaobjetos se agregó Giemsa al 5%, dejando actuar durante 20 minutos.
- \* Por último se lavó bajo chorro de agua de la canilla.

### 3.5.4 Biomarcadores Genotóxicos

A partir de los extendidos sanguíneos obtenidos de larvas y adultos, un total aproximado de 2000 eritrocitos por individuo fueron analizados utilizando microscopio Carl Zeiss trinocular Primo Star (Pack 5) con objetivo de 100 X de inmersión en aceite y se tomaron fotografías con cámara digital Canon Power Shot G10 14,7 Megapíxeles con la utilización de software Axio Vision 4.3.

#### *Ensayo de Micronúcleos (MN)*

Los Micronúcleos son fragmentos de ADN encerrados en pequeñas envolturas de membrana nuclear. La ventaja de esta técnica es que provee un índice de genotoxicidad, y no requiere más que un microscopio (Palma Acuña, 2005).

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

- El diámetro del MN por lo general varía desde 0,4 a 1,6 micras (1/3 a 1/16).
- El MN debe estar separado del núcleo principal, debe haber una identificación clara del límite nuclear sin conexión al núcleo principal y con similar tinción.
- No debe ser refractivo permitiendo diferenciarlo de cualquier material extraño.
- El MN debe ser casi redondo.
- Los MN deben estar incluidos en el citoplasma celular.

#### *Ensayo de Anormalidades Nucleares Eritrocitarias (ANEs)*

Para la identificación de las Anormalidades Nucleares Eritrocitarias (ANE) se siguió a: Carrasco *et al.*, (1990), da Silva Souza y Fontanetti (2006) y Pollo *et al.*, (2012), las cuales han sido clasificadas como:

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

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

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

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

La frecuencia de MN y ANE fue calculada como:

$$\% \text{ MN o ANE} = \frac{\text{Número de células que contienen MN o ANE}}{\text{Número total de células contadas}} \times 1000$$

Se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, para evaluar las diferencias entre sitios para las frecuencias de MN y ANE.

### 3.5.5 Biomarcadores Citotóxicos

En sangre periférica se calculó la frecuencia de eritrocitos inmaduros, eritrocitos mitóticos, eritrocitos anucleados (eritroplastidos). Estas células fueron contabilizadas como medida para evaluar las alteraciones en la dinámica hematológica de los individuos. Los eritrocitos inmaduros fueron identificados siguiendo lo propuesto por Ghillerme *et al.*, (2008):

\* Deben tener un citoplasma de color gris azulado con el núcleo más redondo y más grande que los eritrocitos maduros.

Se calcularon frecuencias media por población y se compararon estos valores entre sitios mediante pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis).

Finalmente los biomarcadores genéticos y citotóxicos fueron evaluados por especie, por sitio en función de las variables ambientales medidas por medio de un análisis de correspondencia canónica. En caso de la especie *H. cordobae* también se incluyó en el análisis el estadio larval.

### 3.5.6 Biomarcadores de comportamiento trófico en larvas

Para conocer la disponibilidad del recurso trófico, el área de botánica realizó un análisis cualitativo de muestras de perifiton: epilíton (rocas), epifiton (macrofitas), epipelon (sedimento) y de episammon (arena), bajo microscopio óptico, para ello se colocó una alícuota de 0,3 ml y se reconocieron los taxones en un aumento de 40x.

En el laboratorio bajo lupa binocular, se extrajo el intestino de las larvas al cual se le midió el ancho y la longitud total. El mismo se dividió en 3 partes iguales y el primer tercio se colocó en 10 ml de agua destilada con unas gotas de formol al 40% para su posterior recuento de algas.

Los ítems alimenticios fueron identificados a nivel de género con microscopio óptico a 40x. Los nombres de los géneros fueron actualizados teniendo en cuenta a Spaulding *et al.*, (2010), Komárek y Hauer (2013) y Guiry y Guiry (2014). Los conteos se realizaron por métodos directos con porta y cubreobjetos de 24x50 mm siguiendo transectas (Gómez *et al.*, 2009, Rimet y Bouchez, 2011). La unidad de conteo fue el organismo (unicelular, colonial, cenobial) y para las algas filamentosas, una longitud de 30  $\mu\text{m}$  fue contada como una única célula (Hill *et al.*, 2000). La estimación de la densidad algal se realizó siguiendo a Villafañe y Reid (1995). Se obtuvieron los porcentajes de frecuencia de ocurrencia (FO %, porcentaje de individuos que consumieron determinada categoría presa), se estimaron los totales y las frecuencias numéricas N (%) de los distintos ítems alimenticios cuantificables.

Se construyeron curvas de rango-abundancia para analizar y mostrar de manera gráfica la dominancia de algunos grupos y la presencia de especies raras, y si estas relaciones cambiaban entre los ambientes o entre especies.

Todos los taxones algales identificados, fueron asignados a tres gremios morfológicos (Figura 15), alto perfil, bajo perfil y móviles, propuestos por Passy (2007) y Passy y Larson (2011). Específicamente, las algas que se elevan a muy poca altura del sustrato, ya sean inmóviles (adnatas, postradas, erectas y células solitarias, colonias pequeñas y cenobios) o diatomeas de movimiento lento, constituyen el gremio de **BAJO PERFIL**. Las algas unicelulares, coloniales o filamentosas que se extienden a mayor altura sobre el sustrato, conforman el gremio de **ALTO PERFIL** y las diatomeas birafidales de movimiento rápido o algas no diatomeas flageladas al gremio **MÓVILES**.

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para comparar la abundancia y la proporción de algas asignada a cada gremio morfológico dentro de las especies estudiadas.



*a= ALTO PERFIL*

*b= MÓVILES*

*c y d= BAJO PERFIL*

**Figura 15.** Representación gráfica de los gremios Morfológicos.

Figura tomada de Kelly (2013)

De acuerdo a Rimet y Bouchez (2011), los taxones consumidos fueron asignados a 5 clases considerando su biovolumen (en  $\mu\text{m}^3$ ): **C1** consta de taxones con menos de  $99 \mu\text{m}^3$ , **C2** entre  $100$  y  $299 \mu\text{m}^3$ , **C3** entre  $300$  y  $599 \mu\text{m}^3$ , **C4** entre  $600$  y  $1499 \mu\text{m}^3$  y **C5** mayor que  $1500 \mu\text{m}^3$ . Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para comparar la abundancia y la proporción de algas asignada a cada tamaño en la dieta de cada especie.

Los atributos estructurales (diversidad y riqueza) fueron calculados usando la técnica de rarefacción, debido a que las muestras analizadas presentan valores de abundancias muy diferentes en los hábitats. Esta técnica permite la comparación de la riqueza y diversidad en diferentes ambientes, independientemente del tamaño de la muestra. Además, el tamaño de la muestra se evaluó mediante las curvas de rarefacción, utilizando el software Estimates versión 9.1.0 (Colwell, 1997). La aplicación del método de rarefacción es necesaria para evitar errores de interpretación, ya que es posible realizar las distintas comparaciones entre dietas, considerando idénticos tamaños muestrales. El procedimiento de este método que permite equiparar las abundancias, es el de “rarificar” las muestras.

En el caso de las larvas de las dos especies (*R. arenarum* e *H. cordobae*) que se encontraban en sintopia, se calculó el solapamiento de dietas utilizando el índice de Pianka (Pianka, 1973). Los valores de solapamiento de 1,0 indican dietas idénticas o volumen de

los alimentos, mientras que los valores de solapamiento de 0 indican total disimilitud en los productos alimenticios. Se estableció valores intermedios como propone Peltzer *et al.*, (2010) en los siguientes niveles: alto ( $> 0,7$ ), intermedio (0,4 a 0,7) o bajo ( $< 0,4$ ).

Los datos de abundancia y riqueza algal consumida por los renacuajos de *Hypsiboas cordobae*, fueron evaluados en cada sitio de muestreo en función de las variables ambientales a través de un análisis de correspondencia canónica.

### 3.5.7 Hemoparasitos

La presencia de hemoparasitos intra y extracelulares se realizó en los extendidos de sangre periférica siguiendo la bibliografía específica (Žičkus, 2002; Cabagna *et al.*, 2009, 2014). Donde, el reconocimiento fue de acuerdo a la posición, forma y morfología. Debido a que la mayoría de los tripanosomas de diferentes regiones geográficas son polimórficos (Bardsley y Harmsen, 1973; Desser, 2001), se sugiere denominar a estos parásitos como *Trypanosoma* sp. cuando solo se cuenta con extendidos sanguíneos para su identificación.

Se calcularon dos parámetros de acuerdo a Korzh y Zadorozhnyaya (2013):

- I) *Grado de infestación*: como la proporción de individuos infestados en relación al número total de individuos analizados.
- II) *Intensidad de infestación*: como la cantidad de eritrocitos infestados con respecto a 1000 células observadas.

La parasitemia se consideró discreta cuando 3% o menos de los eritrocitos estaban infectados y grave cuando el igual o mayor que el 4% de los eritrocitos estaban infectados (Korzh y Zadorozhnyaya, 2013).

La intensidad de infección de los hemoparásitos extracelulares se calculó como el número de parásitos por cada 100 campos bajo microscopio en 40x. Se consideró “*alta intensidad*” cuando por cada 100 campo se registran tres o más hemoparásitos y “*baja intensidad*” cuando por cada 100 campo se registran dos o menos hemoparásitos (Žičkus, 2002).

### 3.5.8 Trabajo experimental: Prueba de AMPHITOX modificado

**Toma de muestras:** Las muestras de agua se obtuvieron de (1) Arroyo Los Cerros Negros antes de la mina, (2) Arroyo Los Cerros Negros a la altura de la mina (3) A° Los Vallecitos y (4) Las Piletas de decantación, en bidones plásticos de 5 lts, los cuales fueron transportados al laboratorio.

**Obtención de embriones:** Después de las primeras lluvias durante el mes de octubre se seleccionó al azar un amplexo de *R. arenarum* de la población que se encuentra en la “Charca las Brujas” ubicada en el campus de la Universidad Nacional de Río Cuarto donde se extrajo un 5% del total de la puesta. Posteriormente fue colocada en bandejas plásticas con agua para observar su desarrollo. Una vez que los embriones alcanzaron los estadios 20-25 de Gosner (1960) se seleccionaron al azar 240 embriones, para la realización del bioensayo.

**Prueba de toxicidad:** Se tomaron al azar 10 larvas y el bioensayo se realizó por duplicado para cada sitio. Las larvas fueron colocadas en placas de Petri de vidrio con 100 ml de las muestras de agua superficial tomada de cada uno de los sitios con 4 concentraciones diferentes: 25%, 50%, 75% y 100%, utilizando para ello agua destilada. Los controles por duplicado se realizaron con agua potable de clorada.

Las muestras fueron mantenidas en laboratorio a temperatura ambiente con una renovación de las soluciones cada 24 hs, suministrando lechuga hervida “*ad libitum*” como alimento.

La supervivencia embrionaria y mortalidad se registró diariamente durante 14 días para evaluar la exposición crónica de los individuos a las diferentes muestras. Al finalizar el experimento se registró la longitud total de las larvas, las malformaciones y posteriormente se extrajo una muestra de sangre directamente del corazón para el análisis de los biomarcadores genéticos.

Los datos obtenidos fueron tratados mediante comparaciones entre tratamientos, utilizando ANOVA, previo chequeo de los supuestos de normalidad (test Shapiro-Wilks) y homogeneidad de varianzas (test Levene). En caso de dar diferencias significativas se realizaron pruebas a posteriori (Tukey). Todos los cálculos fueron realizados utilizando InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012), con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

Los resultados que se muestran a continuación corresponden a los muestreos realizados entre septiembre a marzo (periodo de actividad de las especies estudiadas) de 2013 a 2016. Lo primero que se presenta es una descripción de los sitios, luego las variables de hábitat y finalmente los datos obtenidos para cada biomarcador. Dentro de cada biomarcador se presenta los resultados obtenidos para cada estadio (Larva – Metamorfoseado – Adulto) por especie (*Rhinella arenarum* e *Hypsiboas cordobae*).

### 4.1 Caracterización de los sitios de muestreo

Los sitios fueron reconocidos en el campo donde se relevaron variables relacionadas a la caracterización y descripción del hábitat (Tabla 1). La distancia de los sitios al campamento minero fue variable, siendo el arroyo Hylas el más distante fuera del campamento.

En cuanto a las variables hidráulicas; la profundidad y el ancho del cauce fue similar en los Arroyos, pero en las Piletas de decantación se registró una profundidad muy elevada. Por otro lado, la velocidad de corriente varió entre los sitios, con los valores máximos en A°CNa y mínimos en A°H un arroyo de primer orden. Las barrancas de mayor altura y las pendientes más pronunciadas se registraron en A°CNa y A°CNm (Tabla 1).

El mayor porcentaje de cobertura del suelo registrado fue en A°V y A°H debido principalmente a la presencia de cortaderas y numerosas especies de gramíneas (pastizal de altura). Mientras que el menor porcentaje se observó en las Piletas de decantación ya que solo se encuentra vegetación palustre semisumergida (Figura 12).

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

La actividad antrópica en los sitios de estudios fue variable siendo algunos sitios más antropizados que otros. Por ejemplo el A°CNm y las PD son los que más intervención antrópica presentan, ya que sobre el A°CNm se encuentra una planta de molienda de roca,

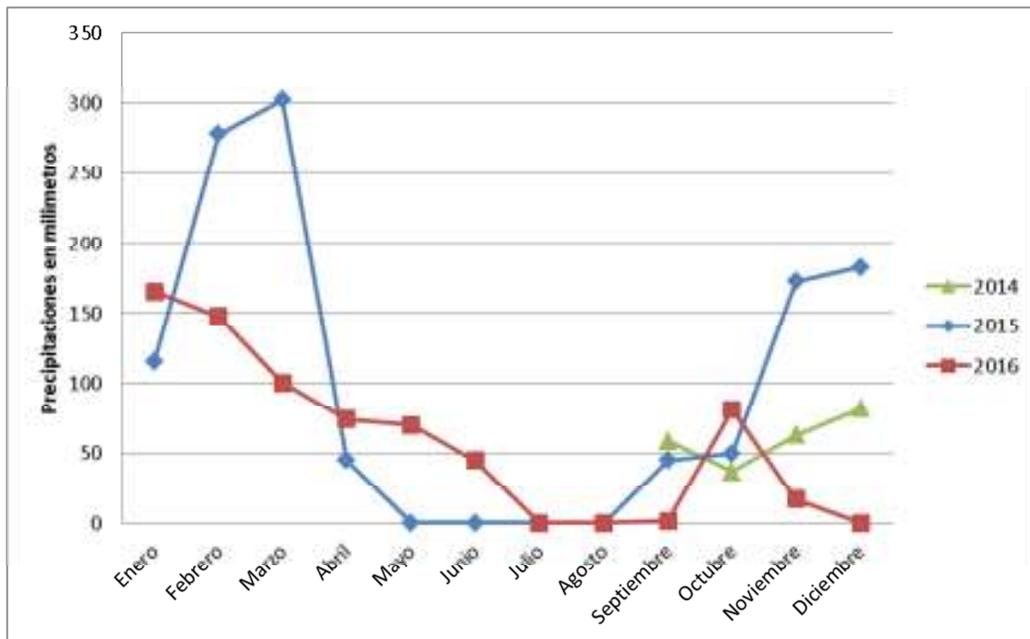
puentes, habitaciones, comedor, etc. El A°CNa y A°V presentan baja actividad antrópica. En el primer sitio podemos citar a la extracción de minerales y en el segundo las bombas de extracción de agua utilizada en el proceso de flotación de la fluorita y depósito de chatarra. Finalmente, el arroyo las Hylas es el sitio con escasa actividad antrópica (Tabla 1).

**Tabla 1.** Variables de caracterización y descripción de cada sitio de muestreo

	A°H	A°V	A°CNa	A°CNm	PD
<b>Tipo de roca madre</b>	Metmórfica	Metamórfica	Granítica	Granítica	Loésico
<b>Coordenadas</b>	32°30'23''S 64°46'44''O	32°29'55''S 64°47'44''O	32°30'13''S 64°48'14''O	32°30'09''S 64°47'42''O	32°30'11''S 64°47'35''O
<b>Distancia del sitio a la mina (m)</b>	1750	600	1100	150	100
<b>Profundidad del cauce (cm)</b>	20	35	22	18	200
<b>Ancho de cauce (m)</b>	2,9	4	4.5	5.5	-
<b>Velocidad de corriente m/min</b>	5.6	8.1	15.6	8.9	-
<b>Borde Vegetado (%)</b>	85	65	50	30	15
<b>Tipo y altura de la vegetación</b>	Cortaderas (1.5m) Gramineas (0.5m)	Cortaderas (1.5m) Gramineas (0.5m)	Cortaderas (1.5m)	Cortaderas (1.5m) Arboles (5m)	Juncos (3m)
<b>Barrancas; terrazas y pendiente</b>	Terrazas amplias Pendiente media	Barrancas (1m) Terrazas amplias Pendiente media	Barrancas (8m) Pendiente alta	Barrancas (5m) Pendiente media	No Pendiente nula
<b>Presencia de especies exóticas</b>	No	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha)	No	<i>Lithobates catesbeianus</i> (Rana toro)
<b>Actividad antrópica</b>	Ganadería extensiva	Depósito de chatarra y bombas de extracción de agua	Voladura de suelo y extracción de fluoruro de calcio	Molienda y lavado de roca Campamento minero	Decantación de sedimento producto del proceso de flotación

#### 4.2 Variables físico-químicas

En la Figura 16 se puede observar los registros de lluvia desde el 2014 al 2016 en la zona de muestreo. El año 2015 fue el más lluvioso con una media anual de 1190 milímetros, siendo los meses de verano los que aportan mayor cantidad de milímetros. En el gráfico se puede apreciar la faltante de datos para los meses de enero a agosto correspondiente al año 2014, esto se debe a que en ese periodo la estación meteorológica no estaba instalada en el campamento.



**Figura 16.** Precipitaciones mensuales por año de muestreo en la mina los Cerros Negros

Con respecto a los valores medios de los parámetros físico-químicos del agua superficial se muestran en la Tabla 2 y Figura 17. La temperatura del agua vario entre sitios ( $F_{4, 100}=5,70$ ;  $p<0,0001$ ), los arroyos mostraron valores similares, mientras que las Piletas de decantación presentaron valores mayores de temperatura (Tabla 2). Teniendo en cuenta los años (Figura 12) vemos un comportamiento similar en todos los sitios, excepto para el sitio las Piletas de decantación en el año 2015, donde se registró temperaturas por debajo de los 20 °C.

Con respecto al pH este parámetro mostro diferencias entre los sitios estudiados ( $F_{4,100}=22,68$ ;  $p<0,0001$ ). Los arroyos que circulan por roca granítica (con alto contenido de F-), presentaron valores de pH promedio de 7,70, mientras que los arroyos que circulan por roca metamórfica (con bajo contenido de F-) no se diferenciaron entre ellos con un valor promedio de 8,40 (Figura 12). En el ambiente artificial (Piletas de decantación) el valor de pH promedio fue de 8,60, similar a los arroyos del ambiente metamórfico (Figura 12).

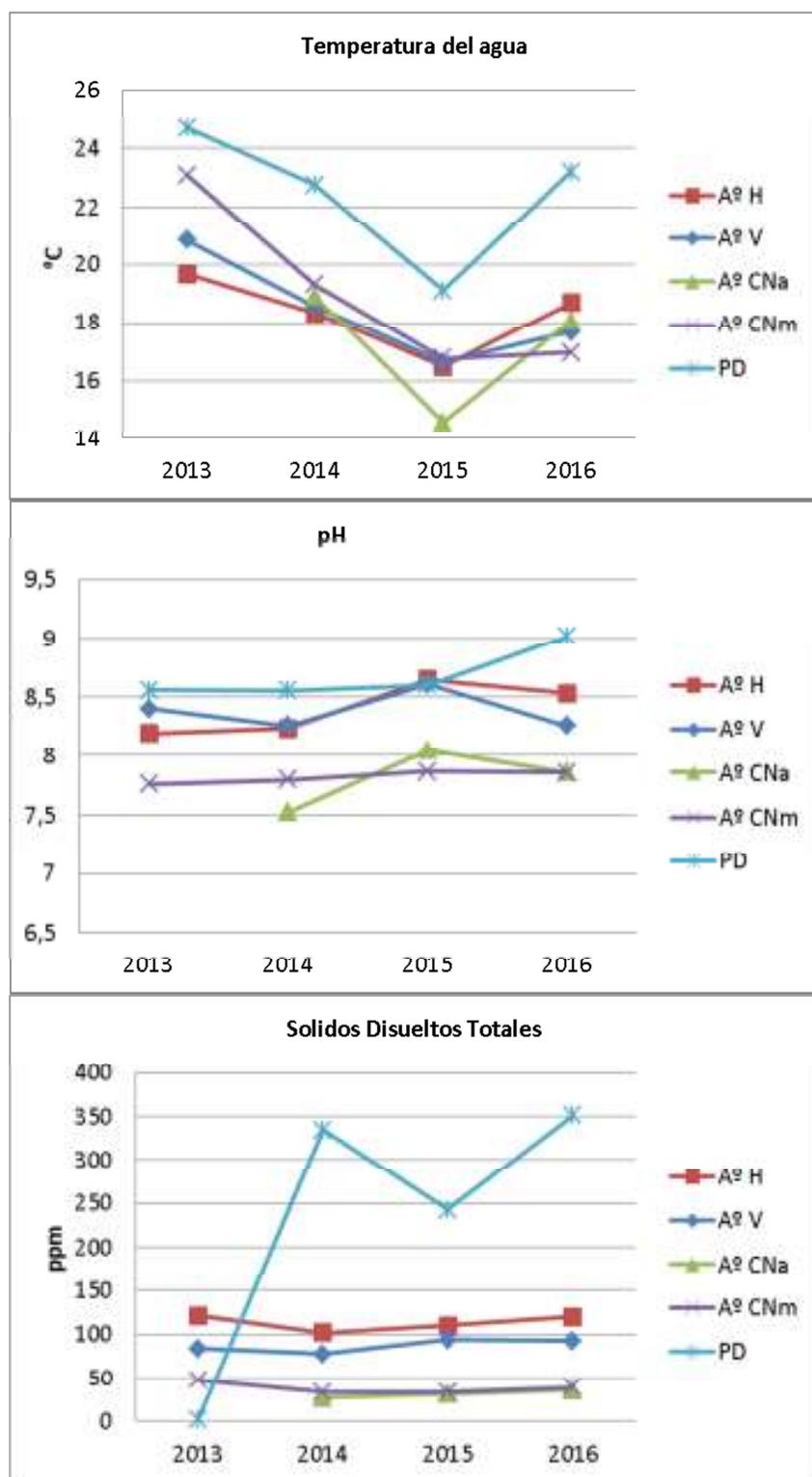
Otro parámetro medido fue el porcentaje de oxígeno disuelto en agua, el cual proviene de la fotosíntesis y de la atmósfera. Esta variable fue registrada en todos los sitios a partir del año 2015. No se observan diferencias entre sitios ( $F_{4,100}=1,78$ ;  $p=0,10$ ), pero al compararlos entre años, observamos diferencias entre sitios, arroyos las Hylas y Las Piletas de decantación muestran los valores más bajos para el año 2015 (Figura 12).

Las demás variables medidas mostraron diferencias significativas entre sitios: sólidos disueltos totales (Kruskal-Wallis,  $H=28,69$ ;  $p<0,0001$ ), salinidad (K-W,  $H=36,93$ ;  $p<0,0001$ ) y conductividad (K-W,  $H=58,04$ ;  $p<0,0001$ ). Los arroyos que circulan sobre ambiente metamórfico presentaron valores de conductividad similares que los que circulan sobre granito, diferenciándose ambos ambientes de Las Piletas de decantación. En este último sitio, los mayores valores de conductividad fueron registrados en el año 2013 pero fueron decayendo al paso de los años registrando el menor valor el año 2016 (Figura 12). Un comportamiento similar a la conductividad mostro la salinidad (Figura 12). Los sólidos disueltos totales fueron similares en los arroyos, pero muy variables en las Piletas de decantación. La salinidad fue similar en los arroyos y al igual que las otras variables, Las Piletas de decantación mostraron valores mayores (Tabla 2 y Figura 12).

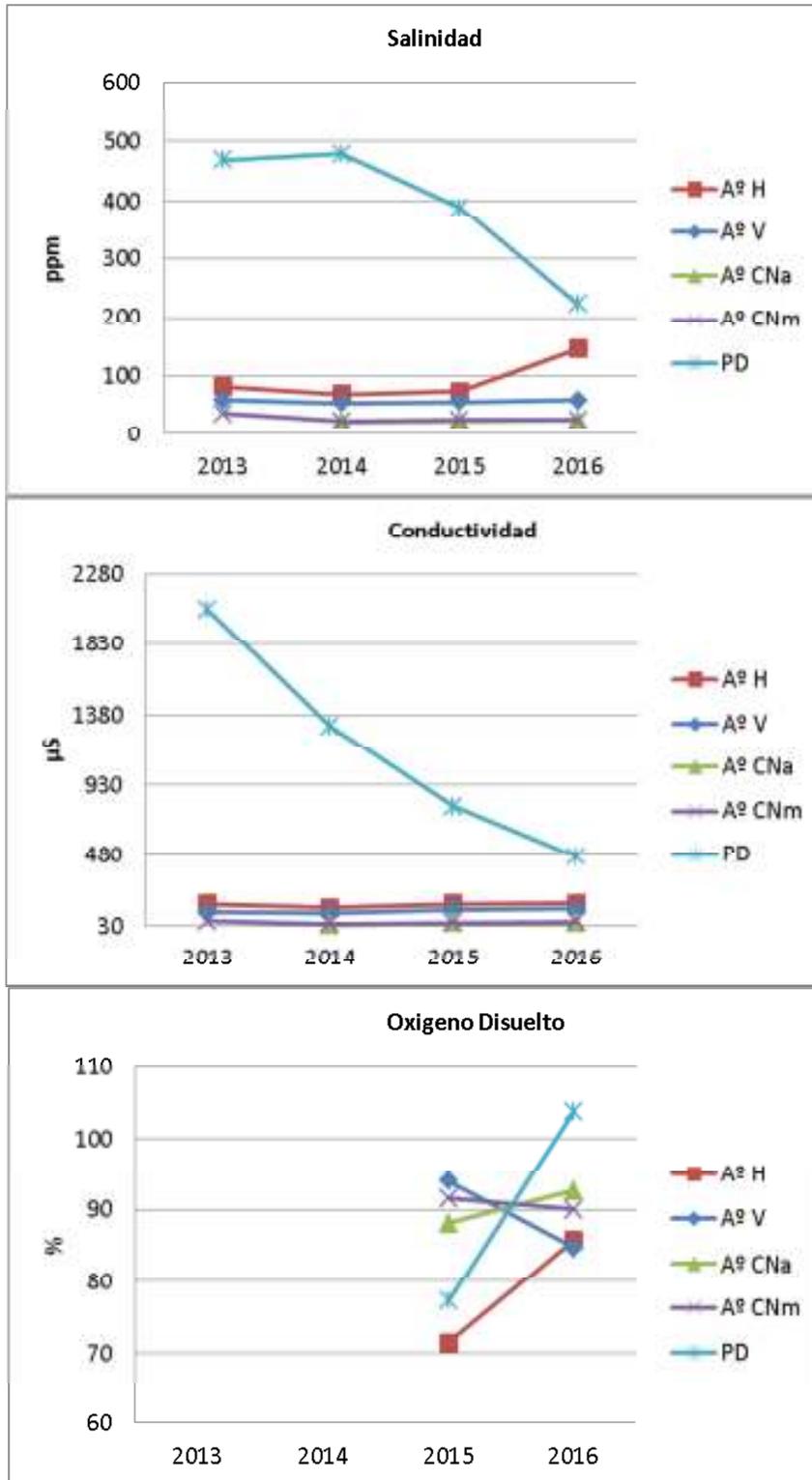
**Tabla 2.** Valores medios, desvío estándar, máximo y mínimo de las variables fisico-químicas registradas *in situ*

Sitio	T° Agua °C	pH	SDT (ppm)	S (ppm)	C (µS)	OD (%)
<b>A° H</b>	18,07 ± 2,85 <sup>A</sup> (12,5 – 22,0)	8,37 ± 0,32 <sup>C</sup> (7,74-8,96)	107,33 ± 18,82 <sup>C</sup> (57,6 - 124)	72,59 ± 12,34 <sup>A</sup> (40,1- 85,3)	158,02 ± 26,72 <sup>C</sup> (92,19 - 204,49)	73,48 ± 9,54 (56,90-83,90)
<b>A° V</b>	18,33 ± 2,92 <sup>A</sup> (12,8 - 23,5)	8,40 ± 0,28 <sup>C</sup> (7,73-8,98)	83,77 ± 17,85 <sup>C</sup> (40,60 - 128,50)	55,38 ± 10,93 <sup>A</sup> (29,7- 67,6)	120,99 ± 26,14 <sup>C</sup> (64,35 - 170,24)	92,3 ± 11,04 (78,2-112)
<b>A° CNa</b>	17,47 ± 3,65 <sup>A</sup> (10,20- 22,30)	7,70 ± 0,44 <sup>A</sup> (6,70-8,39)	28,11 ± 6,34 <sup>A</sup> (16,8-38,10)	23,43 ± 3,51 <sup>A</sup> (15,50-28,90)	42,51 ± 11,90 <sup>A</sup> (27,34-60,54)	88,15 ± 1,77 (86,9-89,4)
<b>A° CNm</b>	19,12 ± 3,18 <sup>A</sup> (11,50-24,20)	7,81 ± 0,31 <sup>B</sup> (7,24-8,36)	35,33 ± 15,06 <sup>A</sup> (19,8-76,4)	26,56 ± 7,71 <sup>A</sup> (17,6 - 54,7)	50,45 ± 20,51 <sup>A</sup> (29,84 - 102,78)	91,53 ± 14,11 (75,7-110)
<b>PD</b>	22,06 ± 4,81 <sup>B</sup> (12,20-29,5)	8,61 ± 0,43 <sup>D</sup> (7,35-9,4)	248,17 ± 344,53 <sup>B</sup> (1,05-887)	435,47 ± 373,41 <sup>B</sup> (1,01 - 984)	1224,16 ± 777,11 <sup>B</sup> (2,14-2535,36)	82,91 ± 19,67 (62,5-117)

A°H = arroyo Las Hylas; A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNa= arroyo Los Cerros Negros antes de la mina; A°CNm = arroyo Los Cerros Negros mina y PD = Piletas de decantación, SDT= Sólidos Disueltos Totales, S= Salinidad; C= conductividad, OD= oxígeno disuelto. Las letras muestran los resultados de las pruebas a posteriori. Letras iguales no son significativamente diferente (P > 0.05).



**Figura 17.** Gráfico de puntos de las variables físico-químicas registradas *in situ* en los diferentes años de muestreo. A°H = arroyo Las Hylas, A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNa= Los Cerros Negros antes de la mina; A°CNm = arroyo Los Cerros Negros mina; PD = Piletas de Decantación.



**Figura 17.** Gráfico de puntos de las variables físico-químicas registradas *in situ* en los diferentes años de muestreos. A°H = arroyo Las Hylas, A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNa= Los Cerros Negros antes de la mina; A°CNm = arroyo Los Cerros Negros mina; PD = Piletas de Decantación.

En la Tabla 3 se muestra el análisis físico-químico de laboratorio de las muestras de aguas superficiales de los periodos 2013 - 2015 de los sitios de estudio. En dichas temporadas no se detectaron en las muestras de agua nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ).

En general, las muestras de arroyos sobre roca metamórfica presentan concentraciones más elevadas en los iones  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  con respecto a las localizadas en ambiente granítico (Tabla 3).

Las menores concentraciones del ión  $\text{Cl}^-$  corresponden a las muestras ubicadas sobre el A° Los Vallecitos circulando por roca metamórfica.

En Cerros Negros mina la mayoría de los iones medidos en agua en el año 2015 presentaron valores muy altos con respecto a años anteriores.

**Tabla 3.** Análisis físico-químico de laboratorio

Sitio	Fecha	$\text{CO}_3$ mg/l	$\text{HCO}_3^-$ mg/l	$\text{SO}_4^-$ mg/l	$\text{Cl}^-$ mg/l	$\text{Na}^+$ mg/l	$\text{K}^+$ mg/l	$\text{Ca}^{++}$ mg/l	$\text{Mg}^{++}$ mg/l	$\text{NO}_3^-$ mg/l	$\text{NO}_2^-$ mg/l	$\text{F}^-$ mg/l	$\text{As}^{+3/+5}$ µg/l	Dza
A°H	2013	0,0	107,5	22,4	4,3	7,6	1,0	22,4	6,8	0,0	0,0	0,2	0,0	84
	2014	3,6	76,3	25,2	4,3	8,0	1,0	19,2	2,4	0,0	0,0	0,2	0,0	58
	2015	0,0	65,0	24,8	2,9	6,6	0,7	12,0	4,9	0,0	0,0	0,3	1,0	50
A°V	2013	0,0	85,0	16,3	2,9	8,9	0,4	16,0	6,8	0,0	0,0	0,5	2,0	68
	2014	0,0	12,5	6,1	2,9	4,1	0,4	2,4	1,0	0,0	0,0	0,3	2,0	16
	2015	0,0	25,0	9,8	2,9	6,8	0,1	4,0	2,0	0,0	0,0	1,8	6,0	18
A°CNa	2013	0,0	27,5	9,4	2,9	6,7	0,3	4,8	2,9	0,0	0,0	2,6	0,0	24
	2014	0,0	17,5	7,1	2,9	4,6	0,3	4,0	1,5	0,0	0,0	1,2	2,0	16
	2015	0,0	82,5	32,6	22,9	22,2	1,2	17,6	4,4	0,0	0,0	2,5	1,0	62
A°CNm	2013	0,0	545	123,4	542,9	618,8	11,1	17,6	8,8	0,0	0,0	16,8	4,0	80
	2014	0,0	205,0	80,7	214,3	226,5	8,1	19,2	4,9	0,0	0,0	11,6	2,0	68
	2015	0,0	290,0	150,5	428,6	433,8	17,0	33,6	8,3	0,0	0,0	4,0	3,0	118
PD	2013	0,0	545	123,4	542,9	618,8	11,1	17,6	8,8	0,0	0,0	16,8	4,0	80
	2014	0,0	205,0	80,7	214,3	226,5	8,1	19,2	4,9	0,0	0,0	11,6	2,0	68
	2015	0,0	290,0	150,5	428,6	433,8	17,0	33,6	8,3	0,0	0,0	4,0	3,0	118

A°H = arroyo Las Hylas; A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNa= arroyo los Cerros Negros antes de la mina y A°CNm = arroyo Los Cerros Negros mina y PD = Piletas de decantación. Dza= Dureza

Los cationes mayoritarios,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , poseen concentraciones mayores en los efluentes de las Piletas de decantación y en los arroyos del ambiente metamórfico.

El ión fluoruro en aguas de ambientes metamórficos se encuentra en concentraciones media de 0,30 mg/l, mientras que en ambiente granítico la concentración media es de 1,60 mg/l.

En la Tabla 4 se muestra la clasificación geoquímica del agua obtenida a partir de las determinaciones físico-químicas realizadas en laboratorio.

**Tabla 4.** Clasificación del agua de los sitios muestreados. A°H = arroyo Las Hylas; A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNa = arroyo Los Cerros Negros antes de las mina; A°CNm = arroyo Los Cerros Negros en la mina y PD = Piletas de decantación.

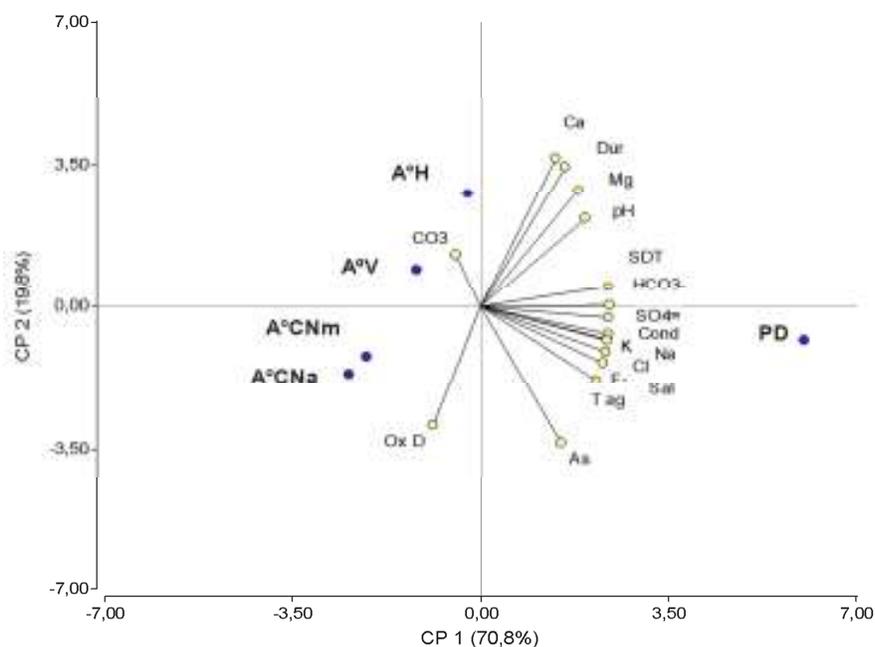
Sitio	Por salinidad	Por dureza	Geoquímica
A°H	Dulce	Algo Dura	Bicarbonatada Cálcica
A°V	Dulce	Algo dura	Bicarbonatada Cálcica
A°CNa	Dulce	Blanda	Bicarbonatada-Sulfatada Sódica Cálcica
A°CNm	Dulce	Blanda	Bicarbonatada Sódico-Cálcica
PD	Dulce	Algo Dura	Clorurada-Bicarbonatada Sódica

El análisis de Componentes Principales (ACP) y el Biplot realizado con las medias de las variables ambientales medidas *in situ* y las químicas de laboratorio se muestran en la Tabla 5 y Figura 18. Con las dos primeras componentes es posible explicar el 90% de la variación total. Los autovectores (e1 y e2) muestran los coeficientes con que cada variable original fue ponderada para conformar las componentes principales CP1 y CP2 (Tabla 4). Para la construcción de CP1, carbonatos y oxígeno disuelto reciben pesos negativos, mientras que el resto de las variables presentan pesos positivos altos y el resto de las variables tienen casi el mismo peso incluido la temperatura. En la CP2 se observa que las variables que presentan mayor variabilidad son el calcio y dureza (pesos positivos más altos) junto al arsénico y oxígeno disuelto (pesos negativos más altos). En el Biplot (Figura 18) la primera componente (CP1) separa el oxígeno disuelto y los carbonatos del resto de las variables, por lo tanto la mayor variabilidad entre los sitios podría ser explicada por las concentraciones de dichas variables. Asociados a dichos compuestos se encuentran los

sitios Los Vallecitos, Arroyo Las Hylas, arroyo Cerros Negros antes de la mina y arroyo Cerros Negros mina.

**Tabla 5:** Valores de los autovectores de las componentes principales. En “negrita” se destacan los valores positivos y negativos más altos

Variables	vectores	
	e1	e2
<b>T agua</b>	0,26	<b>-0,21</b>
<b>pH</b>	0,23	0,26
<b>SDT</b>	0,29	0,06
<b>Conduct</b>	0,28	-0,10
<b>Sal</b>	0,29	-0,08
<b>CO3</b>	<b>-0,06</b>	0,15
<b>HCO3-</b>	0,29	0,01
<b>SO4=</b>	0,29	-0,03
<b>Cl</b>	0,28	-0,13
<b>Na</b>	0,28	-0,13
<b>K</b>	0,28	-0,10
<b>Ca</b>	0,17	<b>0,44</b>
<b>Mg</b>	0,22	0,34
<b>F-</b>	0,27	-0,17
<b>As</b>	0,18	<b>-0,40</b>
<b>Dureza</b>	0,19	<b>0,41</b>
<b>Oxígeno Disuelto</b>	<b>-0,11</b>	<b>-0,35</b>



**Figura 18.** Biplot de las variables ambientales y los sitios muestreados

### 4.3 Biomarcadores morfológico

Las medidas corporales (longitud total, peso y condición corporal) de larvas, metamorfoseados y adultos de cada sitio donde se registraron las especie *R. arenarum* e *H. cordobae*, se muestran a continuación.

#### 4.3.1. *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867)

##### 4.3.1.1 Larvas

Larvas de esta especie solo se registró en las Piletas de decantación. Los valores medios de Longitud total (mm) para cada grupo según Gosner (1960) son Grupo 1:  $15,24 \pm 2,82$ ; Grupo 2:  $27,96 \pm 4,41$  y Grupo 3:  $29,16 \pm 3,79$ .

##### 4.3.1.2. Metamorfoseados

Al igual que las larvas de esta especie, se han colectado metamorfoseados entre el estadio 44 - 46 de Gosner, únicamente en las Piletas de decantación. Estos individuos presentaron un peso promedio de  $0,102 \pm 0,021$ gr y una longitud total hocico cloaca de  $9,56 \pm 0,75$  mm.

##### 4.3.1.3. Adultos

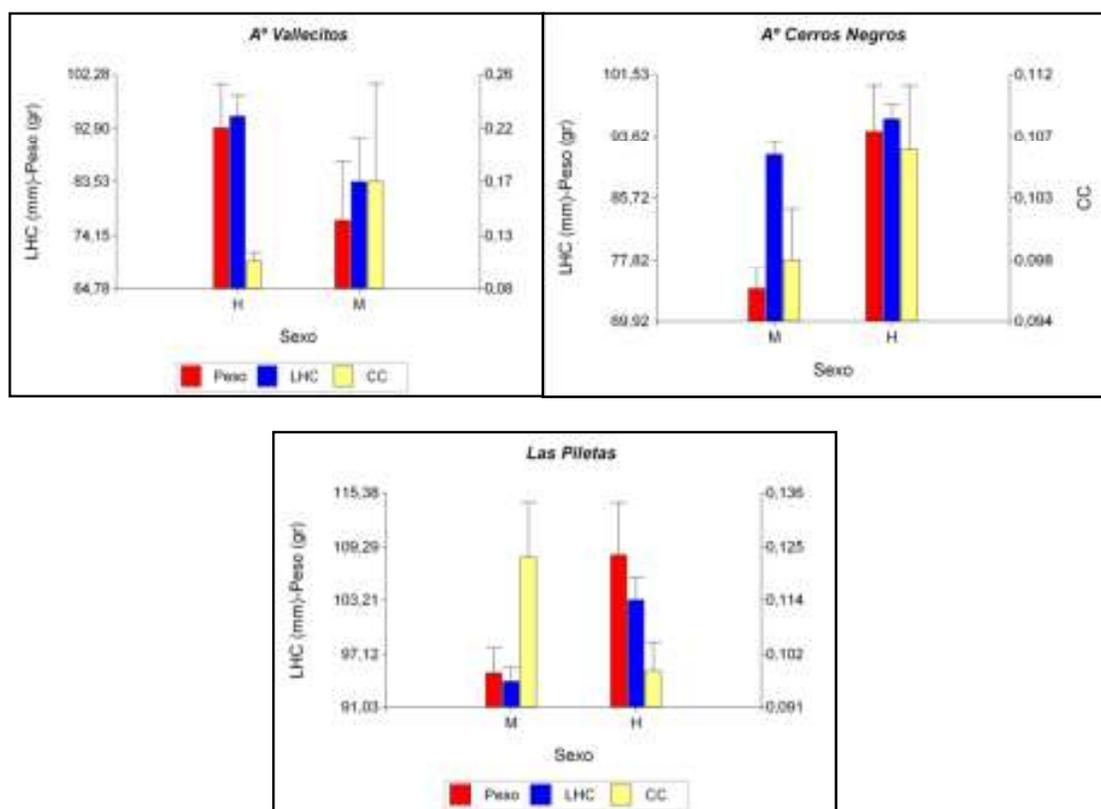
En la Tabla 6 y Figura 19 se muestran los valores medios del largo hocico-cloaca (LHC) el peso (P) y Condición Corporal (CC) registrados en los adultos de *R. arenarum* para cada sitio de muestreo. Para esta especie se midieron: 21 (20♂ - 1♀) en las Piletas de decantación, 21 (4♂ - 17♀) en el arroyo Los Vallecitos y 27 (16♂ - 11♀) en el A° Los Cerros Negros mina. Los machos al compararlos por sitio en cuanto a su largo hocico-cloaca, vemos que no se diferencian entre sitios ( $H= 1,52$ ;  $p=0,46$ ), mientras que para el peso, existe diferencia entre sitios ( $F_{2,37}= 10,36$ ;  $p < 0,001$ ) siendo los individuos de Las Piletas de decantación los de mayor peso. Las hembras del sapo común no se diferenciaron entre sitios para ninguna de las variables medidas (LHC:  $F_{2,26}=0,01$ ;  $p=0,98$ ; P:  $F_{2,26}=0,01$ ;  $p=0,99$ ).

Es importante mencionar que durante este tiempo de muestreo se han recapturado 3 individuos en el arroyo Cerros Negros mina, 2 en los Vallecitos y un individuo en las Piletas de decantación.

**Tabla 6.** Valores medios para el largo hocico-cloaca (LHC), Peso (P) y Condición corporal (CC) por sexo para *R. arenarum*.

Sitio	Macho			Hembra		
	LHC	P	CC	LHC	P	CC
A°V	83,49±15,32	76,75±20,53	0,17±0,16	95,02±14,82	93,00±31,22	0,11±0,03
A°CNm	91,24±6,91	74,06±11,15	0,10±0,02	95,88±6,75	94,29±21,72	0,11±0,02
PD	94,07±9,97	95,03±18,24*	0,12±0,07	103,22±5,64	108,40±13,13	0,10±0,01

A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNm = arroyo Los Cerros Negros mina y PD = Piletas de decantación. \*  $p < 0.01$



**Figura 19.** Valores medios del largo hocico-cloaca (LHC) el peso (P) y Condición Corporal (CC) registrados en los adultos de *R. arenarum* para cada sitio de muestreo.

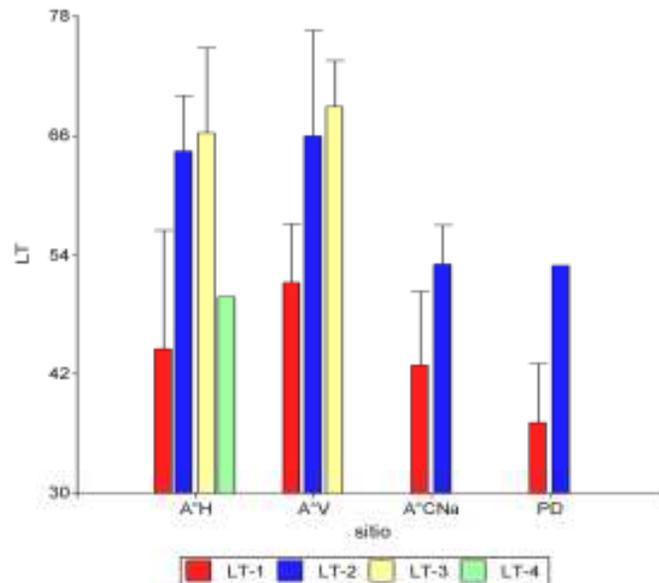
### 4.3.2. *Hypsiboas cordobae* (Barrio, 1965)

#### 4.3.2.1. Larvas

En el Figura 20 se muestra la longitud total en milímetros de las larvas capturadas en cada sitio de muestreo, clasificadas por grupos según la tabla de Gosner (1960). No todos los grupos están representados en los sitios.

Las larvas pertenecientes al grupo 1 son muy diferentes entre sitios siendo las del arroyo Los Vallecitos las de mayor longitud y las de las Piletas de decantación la de menor longitud, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa (K- W, H= 1,50; p=0,22). En general, la longitud total de los renacuajos de los arroyos sobre roca metamórfica (A°H y A°V) es muy parecida entre sí.

El sitio arroyo Las Hylas es el único donde se encuentran representados todos los grupos de larvas.



**Figura 20.** Longitud total (LHC) de larvas de *H. cordobae* en cada sitio de muestreo.

A°H= arroyo Las Hylas; A°V= arroyo Los Vallecitos; PD= las Piletas; Los numeros indican el grupo al que se asignaron (ver materiales y método).

#### 4.3.2.2. Metamorfosados

Durante los periodos de muestreo no se colectaron recién metamorfosados de *H. cordobae* en ninguno de los sitios analizados.

#### 4.3.2.3. Adultos

En la Tabla 7 y Figura 21, se muestran los valores medios del largo hocico-cloaca (LHC), peso (P) y condición corporal (CC) registrados en los adultos de *H. cordobae* para cada sitio donde se registró la especie. Se capturaron: 36 individuos (28♂ - 8♀) de *H. cordobae* en el sitio A° Las Hylas, 32 en las Piletas de decantación (25♂ - 7♀), 21 en el A° Los Vallecitos (16♂ - 5♀) y 14 ♂ en el A° Los Cerros Negros antes de la mina.

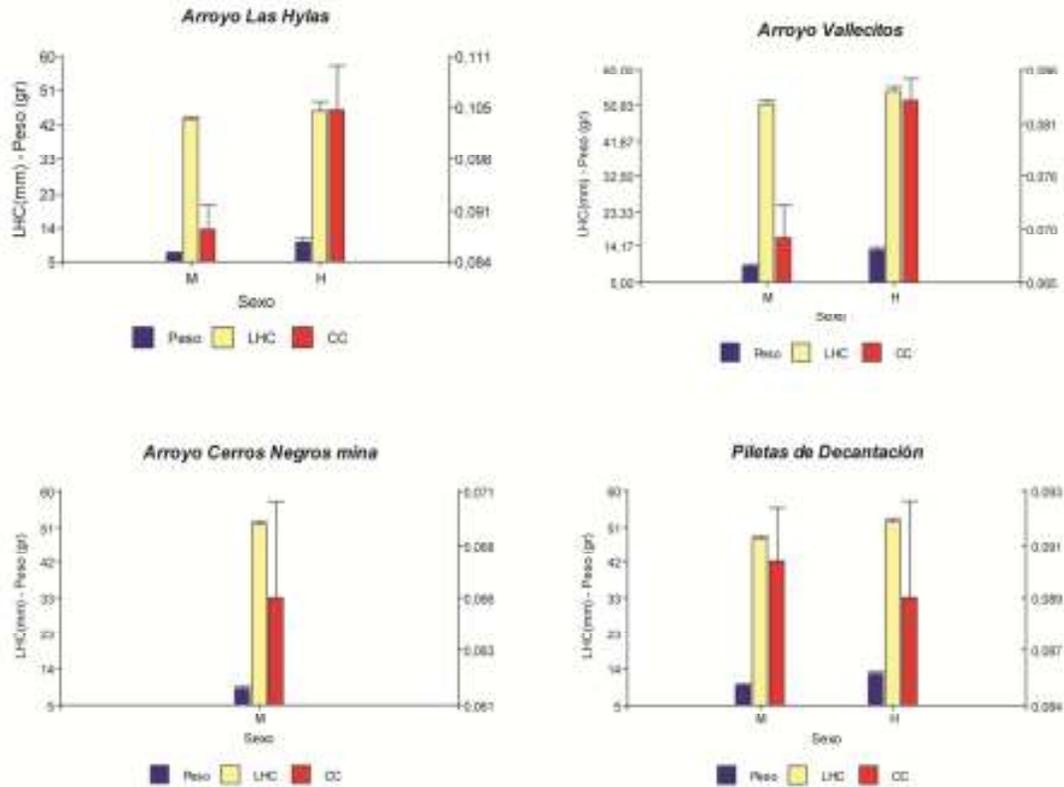
Con respecto a las variables morfométricas se observa que en cuanto al LHC y la P de los machos, existen diferencias entre sitios (LHC:  $F_{3, 67} = 19,64$   $p < 0,001$ ; M:  $F_{3, 67} = 9,46$   $p < 0,001$ ; Tabla 6).

En cuanto a la LHC de las hembras de *H. cordobae* se observan diferencias entre sitios (LHC:  $F_{2, 17} = 6,59$   $p < 0,01$ ) mientras que el peso no fue diferente ( $F_{2, 17} = 2,41$ ;  $p = 0,11$ . Tabla 6).

**Tabla 7.** Medias para el largo hocico-cloaca (LHC), peso (P) y condición corporal (CC) por sexo para *H. cordobae*.

Sitio	Macho			Hembra		
	LHC	P	CC	LHC	P	CC
A°H	43,09 ± 3,70*	7,19 ± 1,59 *	0,09 ± 0,02	45,27 ± 6,81*	10,00 ± 3,93	0,10 ± 0,02*
A°V	50,86 ± 2,90	9,88 ± 1,73	0,07 ± 0,01	54,09 ± 2,57	13,20 ± 1,64	0,08 ± 5,0E <sup>-03</sup>
A°CNa	51,00 ± 3,95	8,55 ± 2,54	0,07 ± 0,02	sd	sd	sd
PD	47,84 ± 3,24	9,96 ± 2,19	0,09 ± 0,01	52,26 ± 2,39	12,71 ± 2,14	0,09 ± 0,01

A°H = arroyo Las Hylas; A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNa = arroyo Los Cerros Negros antes; PD = Piletas de decantación; Sd= sin dato; \*  $p < 0,05$



**Figura 21.** Valores medios del largo hocico-cloaca (LHC), peso (P) y condición corporal (CC) registrados en los adultos de *H. cordobae* para cada sitio muestreado.

#### 4.3.2.4. Anormalidades

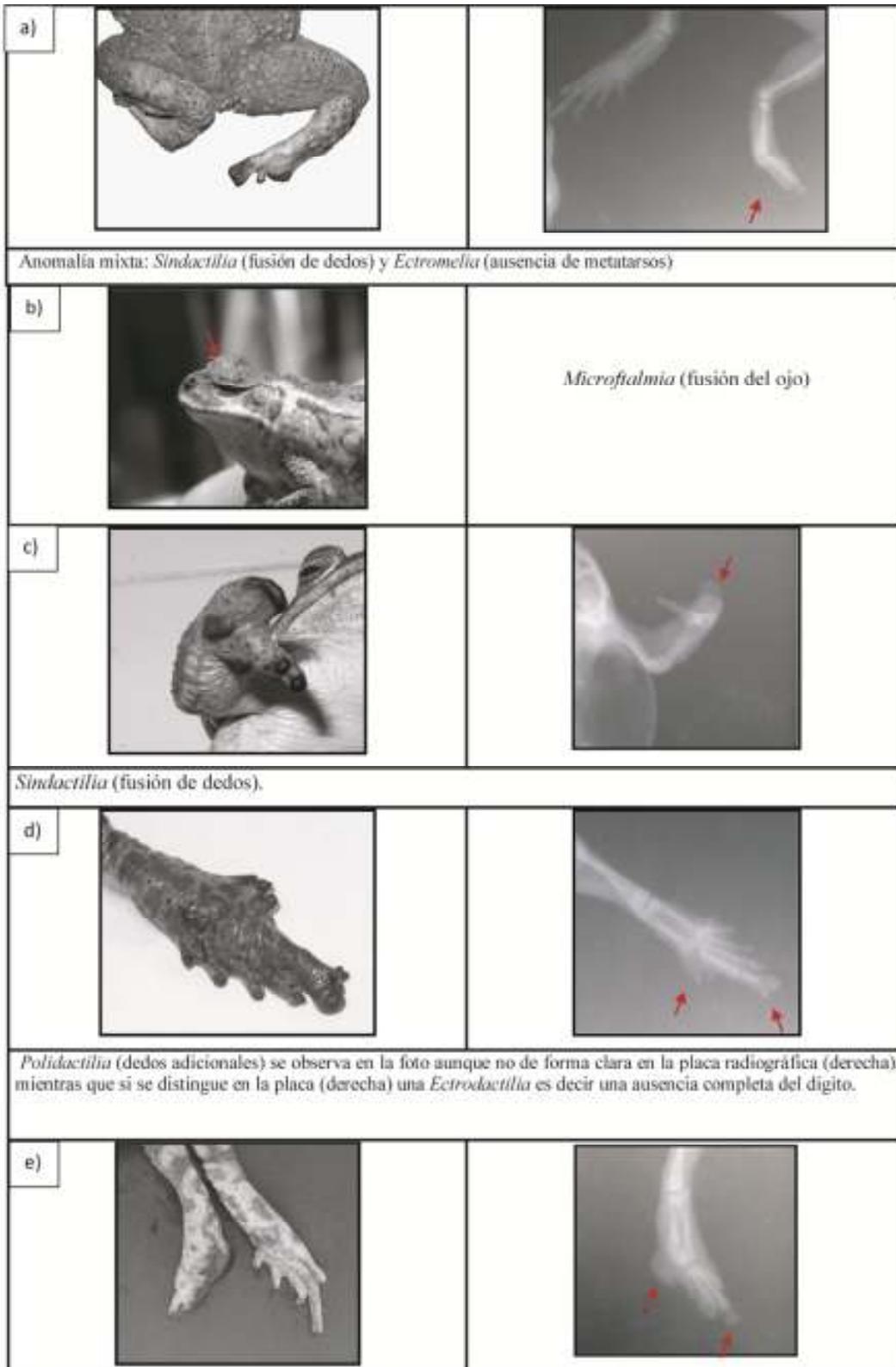
Se observaron anomalías morfológicas en las dos especies. En *R. arenarum* (sapo común) solo los adultos mostraron anomalías (Figura 22), mientras que en *H. cordobae* (ranita trepadora) las anomalías fueron observadas solo en la etapa larval (Figura 23).

En *R. arenarum* se registraron 4 tipos de anomalías morfológicas diferentes y dos anomalías mixtas (Tabla 8, Figura 22). De un total de 43 individuos adultos de *R. arenarum* capturados en las Piletas de decantación el 6,97% presentó algún tipo de anomalía, para el sitio arroyo Los Vallecitos el 4% de 25 individuos capturados y en el sitio arroyo Los Cerros Negros mina el 15,62% de 32 individuos presentó algún tipo de anomalía (Tabla 8).

La comparación estadística entre sitios mostro que las anomalías no fue significativas (test Binomial =  $Z_{PD-A^{\circ}V} = 0,029$ ;  $p > 0,05$ ;  $Z_{PD-A^{\circ}CN} = 0,08$ ;  $P > 0,05$ ;  $Z_{A^{\circ}CN-A^{\circ}V} = 0,11$ ;  $p > 0,05$ ).

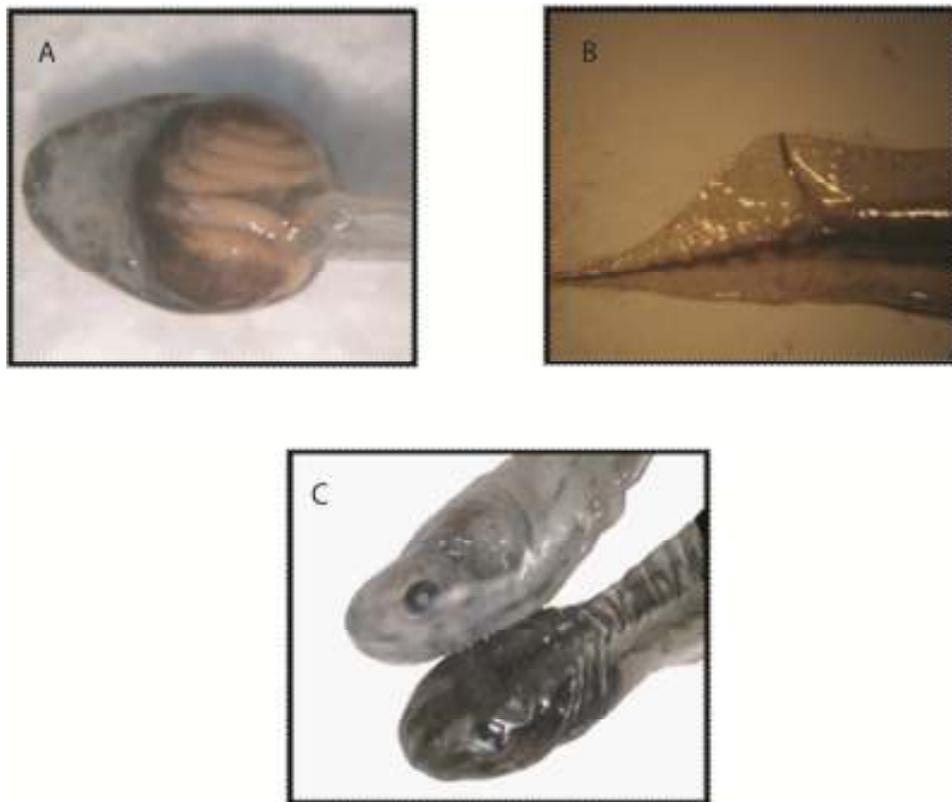
**Tabla 8.** Anormalidades morfológicas en *Rhinella arenarum* por sitio muestreado. Los valores indican el porcentaje relativo de cada tipo de anormalidad con respecto al número total de anormalidades en la categoría, con el número de cada anormalidad enumerado entre paréntesis.

Tipo de anormalidad	Porcentaje relativo de todas las anormalidades morfológicas (n)			
	A°V	A°CNm	DP	Todos los sitios
<b>Sindactilia</b>	-	-	33.3 (1)	1
<b>Ectrodactilia</b>	-	-	33.3 (1)	1
<b>Polidactilia</b>	100 (1)	40 (1)	33.3 (1)	3
<b>Microftalmia</b>	-	20 (2)	-	2
<b>Mix: Sindactilia + Ectrodactilia</b>	-	20 (1)	-	1
<b>Mix: Sindactilia + Ectromelia</b>	-	20 (1)	-	1
<b>Porcentaje de individuos con anormalidades sobre el total capturado</b>	4 (1)	15.62 (5)	6.97 (3)	9



**Figura 22.** Algunas de las anomalías morfológicas registradas en individuos de *R. arenarum*. A la izquierda se muestra la fotografía y a la derecha la placa radiográfica

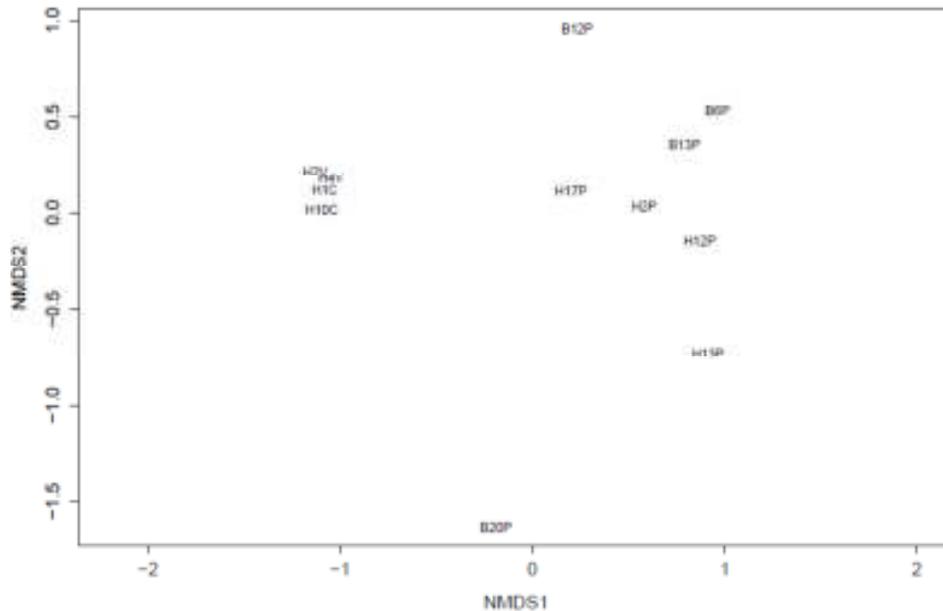
En larvas de *H. cordobae* se registraron tres tipos de anomalías morfológicas (Figura 23). En el sitio Las Piletas de decantación del total de larvas observadas (n=27) un 74% presentó algún tipo de anomalía morfológica. El intestino enroscado en dos espirales diferentes (Fig. 23 a) se presentó con una frecuencia del 25,9%, además en frecuencias altas (80%) las larvas de este sitio presentan una pigmentación más clara que las de los otros sitios (Fig. 23 c). En el sitio arroyo Los Cerros Negros antes de la anomalía cola bifurcada (Fig. 23 b) fue rara ya que se presentó con frecuencias bajas en la muestra, 7,14 % del total de larvas analizadas (n=28). La comparación estadística entre sitio mostro diferencias significativas (test Binomial  $Z_{PD-A}^{CNa} = 0,66$ ;  $p < 0,0001$ ) para el total de anomalías registradas.



**Figura 23.** Anomalías morfológicas registradas en larvas de *H. cordobae* a) Intestino doble espiralado sitio las Piletas de decantación, b) Cola bifurcada sitio arroyo Los Cerros Negros antes de la mina c) ausencia de pigmentación izquierda larva de las Piletas de decantación, derecha larva de Los Cerros Negros antes de la mina.

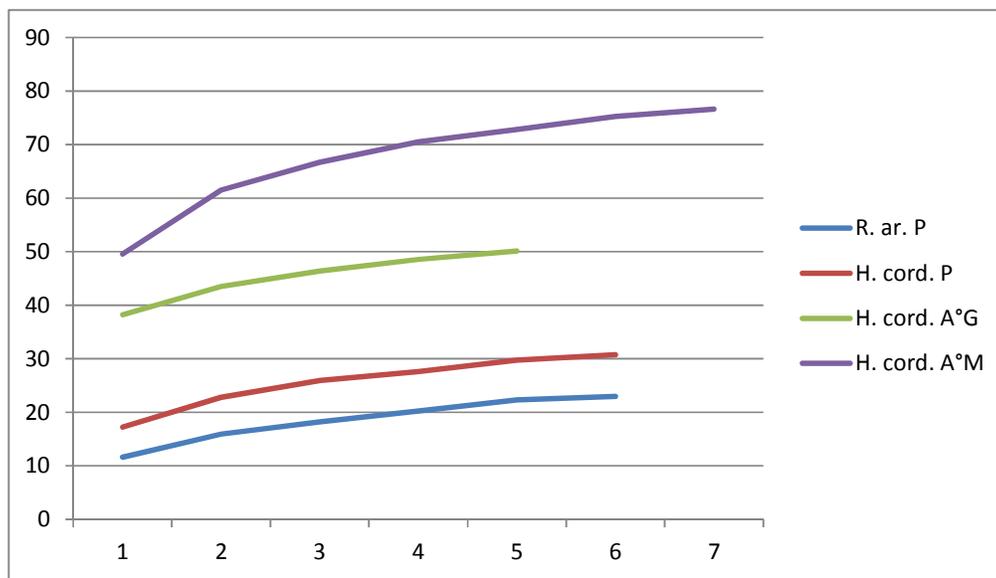
#### 4.4 Biomarcadores de comportamiento trófico en larvas

Se analizaron un total de 20 renacuajos entre los estadios 36-38 de Gosner (1960), 8 renacuajos para el sitio las Piletas de decantación, 7 renacuajos de *H. cordobae* para arroyos que circulan sobre roca metamórfica y 5 renacuajos de *H. cordobae* para arroyo Cerros Negros (roca granita). A partir de la riqueza y abundancia de algas registradas en el intestino, se realizó una ordenación de las muestras mediante un escalamiento no métrico multidimensional (Non-metric multidimensional scaling, NMDS). Esta ordenación se realizó, para describir las diferencias en las comunidades de algas según el sitio de muestreo. En la Figura 24, se muestra el resultado del NMDS, donde se puede observar que las larvas de *H. cordobae* de los arroyos Los Vallecitos y Las Hylas, se diferencian de las larvas de *H. Cordobae* y *R. arenarum* del sitio Las Piletas de decantación, pero no se diferencian entre ellas, en función de las algas consumidas. Por este motivo para los análisis siguientes las larvas de los sitios arroyo Los Vallecitos y Las Hylas fueron agrupadas y denominadas como larvas de arroyos metamórficos.



**Figura 24.** Análisis discriminante de los distintos ítems alimenticios para las larvas de *H. cordobae* (H) y *R. arenarum* (R) de los sitios A° Los Vallecitos, A° Las Hylas y Las Piletas de decantación. Valor de Stress 0.103. HV= *H. cordobae*, arroyo Los Vallecitos; HC= *H. cordobae*, arroyo Las Hylas; HP= *H. cordobae*, Las Piletas; BP= *R. arenarum*, Las Piletas.

Las curvas de Rarefacción de las dos especies se presentan en la Figura 25. Estas, muestran que las curvas parecen haber alcanzado una asíntota para ambas especies, es decir que por más que se analicen más intestinos la riqueza de algas consumidas por sitio no va cambiar.



**Figura 25.** Curvas de rarefacción de las dos especies *R. arenarum* e *H. cordobae*.

En la Tabla 9 se presenta el análisis cualitativo de las muestras de vegetación, guijarros y sedimento para cada sitio. La X indica presencia y la celda pintada indica los géneros más abundantes en la muestra.

El análisis cualitativo muestra, que el arroyo Los Vallecitos, el cual discurre por roca metamórfica, es el que presenta mayor riqueza, con un total de 32 géneros, siendo los más abundantes *Zygnema* sp, *Cymbella* sp y *Navicula* sp. Mientras que el arroyo Los Cerros Negros, el cual todo su recorrido lo hace sobre roca granítica, presentó una menor riqueza (22 géneros) donde *Zygnema* sp y *Cymbella* sp son los más abundantes.

En cuanto al sitio las Piletas de decantación, este fue el que menor riqueza exhibe (13 géneros) siendo los géneros más abundantes *Achnanthydium* sp, *Encyonopsis* sp, *Navicula* sp y *Nitzschia* sp pertenecientes a la división Ochrophyta y el género *Euglena* sp del Phylum Euglenozoa. Géneros de la división Charophyta, no se contabilizaron en este sitio pero si en los demás.

**Tabla 9.** Análisis cualitativo de las muestras de vegetación, rocas y sedimento para cada sitio de muestreo.

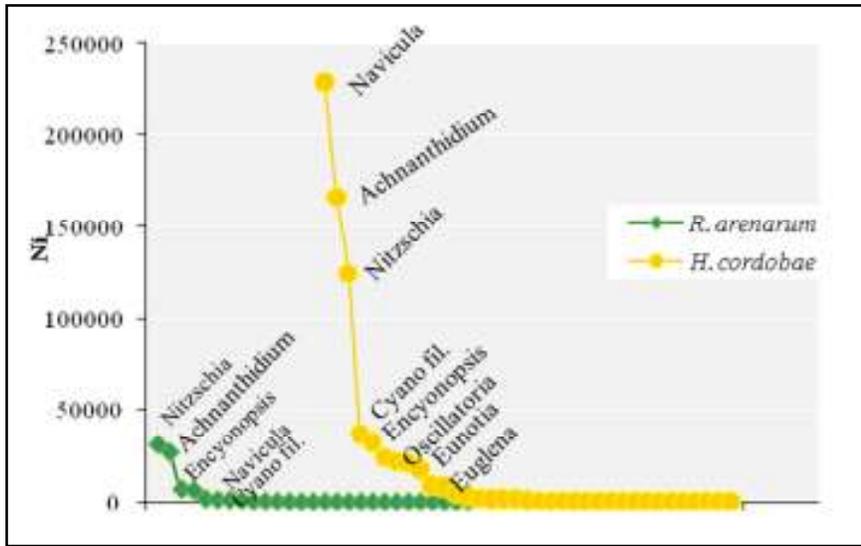
<b>Taxones</b>	<b>A° Hylas</b>	<b>Piletas de decantación</b>	<b>A° Los Vallecitos</b>	<b>A° Los Cerros Negro</b>
<b>División Cyanobacteria</b>				
<i>Aphanocapsa sp</i>	-	-	X	-
<i>Coleodesmium sp</i>	X	-	X	-
<i>Merismopedia sp</i>	-	-	X	-
<i>Microcystis sp</i>	-	-	-	-
<i>Oscillatoria sp</i>	X	X	X	X
<i>Cyanophyceae sp</i>		X	-	-
<b>División Chlorophyta</b>				
<i>Ankistrodesmus sp</i>	-	-	X	-
<i>Bulbochaete sp</i>	-	-	-	X
<i>Chlorococcales sp</i>	X	X	-	-
<i>Desmodesmus sp</i>	-	-	X	-
<i>Monoraphidium sp</i>	-	-	X	X
<i>Oedogonium sp</i>	X	-	X	X
<i>Oocystis sp</i>	-	-	X	-
<i>Scenedesmus sp</i>	X	-	X	X
<i>Ulothrix sp</i>	-	-	X	X
<b>División Charophyta</b>				
<i>Closterium sp</i>	-	-	-	X
<i>Cosmarium sp</i>	X	-	X	X
<i>Desmidium sp</i>	-	-	-	X
<i>Euastrum sp</i>	-	-	-	X
<i>Mougeotia sp</i>	-	-	X	X
<i>Pediastrum sp</i>	-	-	X	-
<i>Spirogyra sp</i>	-	-	X	X
<i>Staurastrum sp</i>	-	-	X	X
<i>Zygnema sp</i>	-	-	X	X
<b>Phylum Euglenozoa</b>				
<i>Euglena sp</i>	-	X	-	-
<b>División Ochrophyta</b>				
<i>Achnanthydium sp</i>	X	X	X	X
<i>Amphipleura sp</i>	X	-	X	-
<i>Amphora sp</i>	X	-	X	-
<i>Cocconeis sp</i>	X	-	X	-
<i>Cymatopleura sp</i>	X	-	-	-
<i>Cymbella sp</i>	X	-	X	X
<i>Cymbopleura sp</i>	X	-	-	-
<i>Diploneis sp</i>	-	-	X	-
<i>Encyonema sp</i>	-	X	X	-
<i>Encyonopsis sp</i>	-	X	X	-
<i>Eunotia sp</i>	-	-	-	X
<i>Fragilaria sp</i>	X	X	X	X
<i>Gomphonema sp</i>	X		X	X
<i>Hantzschia sp</i>	-	X	-	-

**Tabla 9.** Análisis cualitativo de las muestras de vegetación, rocas y sedimento para cada sitio de muestreo.

Taxones	A° Hylas	Piletas de decantación	A° Los Vallecitos	A° Los Cerros Negro
<b>División Ochrophyta</b>				
<i>Karayevia</i> sp	-	-	X	-
<i>Melosira</i> sp	X	-	X	-
<i>Navicula</i> sp	X	X	X	X
<i>Nitzschia</i> sp	X	X	X	X
<i>Pinnularia</i> sp	X	-	-	-
<i>Rhoicosphenia</i> sp	-	-	-	-
<i>Rhopalodia</i> sp	-	X	-	-
<i>Surirella</i> sp	X	-	-	-
<i>Ulnaria</i> sp	X	X	X	X
<b>División Rhodophyta</b>				
<i>Batrachospermum</i> sp	X	-	-	-

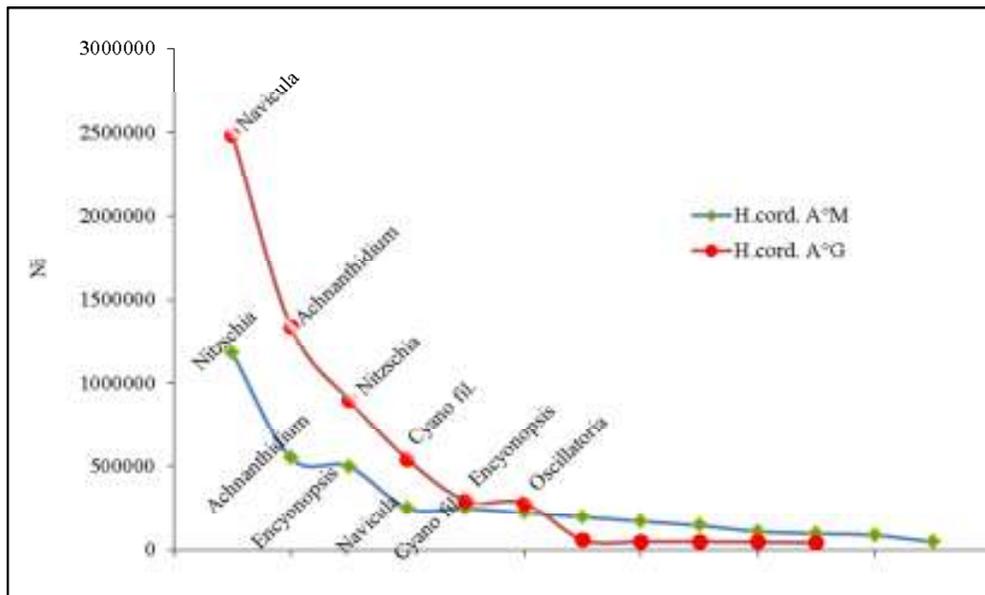
Los resultados obtenidos indicaron que las algas son los ítems alimenticios mayoritarios, presentes en el 100% de los intestinos, principalmente microalgas pertenecientes a 44 géneros. Hubo una predominancia de diatomeas, división Ochrophyta (95% y 83% *R. arenarum* e *H. cordobae*, respectivamente) pero también se registraron representantes de Cyanobacteria, Chlorophyta, Euglenozoa, Dinozoa y Ciliophora, esta última solamente en la dieta de *H. cordobae*. En pequeña proporción se encontraron formando parte de la dieta, restos de tejidos de plantas, estructuras reproductivas de hongos y rotíferos.

El análisis de la dieta de los renacuajos de *R. arenarum* e *H. cordobae* del sitio las Piletas de decantación reveló que la abundancia de algas consumida era muy diferente, con una mayor densidad en el intestino de las larvas de *H. cordobae* (Figura 26). En la dieta de *R. arenarum* la abundancia de los géneros más común era de menos de 50.000 individuos por cm<sup>2</sup>, mientras que en las larvas de *H. cordobae* del mismo sitio, y de Los arroyos la abundancia de los géneros más consumida estaba por encima de los 200.000 individuos por cm<sup>2</sup> (Figura 26).

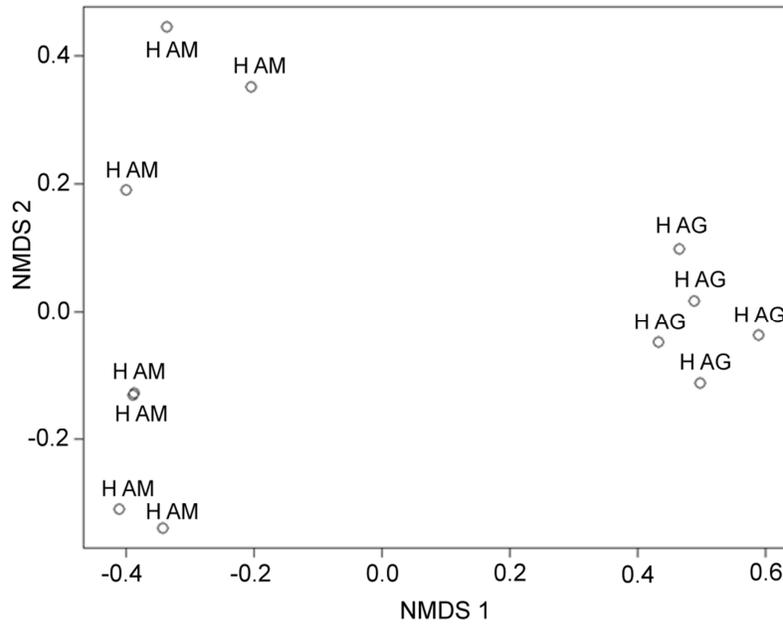


**Figura 26.** Diagramas de rango abundancia (Ni) para los ítems alimenticios de larvas de *R. arenarum* e *H. cordobae* del sitio las Piletas de decantación.

Los renacuajos de *H. cordobae* de los arroyos muestran diferencias en cuanto a la abundancia de ítems alimenticios consumidos (Figura 27) y la riqueza de algas consumidas (Figura 28). Estas diferencias se observan en los renacuajos de los arroyos que circulan sobre roca granítica (Cerros Negros).

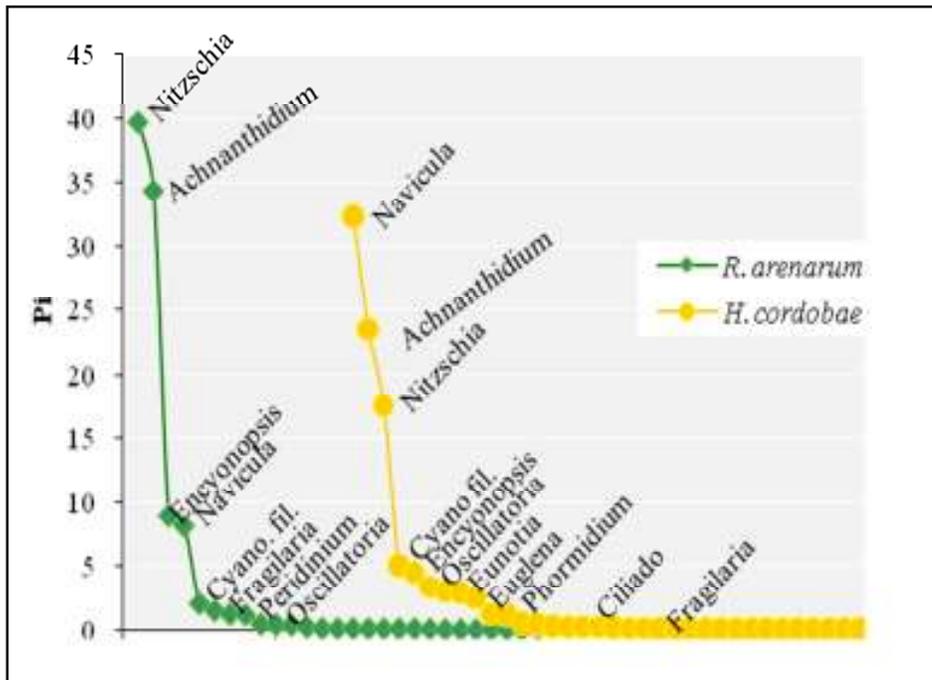


**Figura 27.** Diagrama de rango abundancia (Ni) para de los ítems alimenticios de larvas de *H. cordobae* de Los arroyos sobre roca metamórfica (AM) y de arroyo Cerros Negros sobre roca granítica (AG).



**Figura 28.** Ordenación de los ítems consumidos por *H. cordobae* en los arroyos de roca metamórfica (H AM) de los de roca granítica (H AG). Valor de Stress: 0.03

Se observó también que la composición de la dieta de cada especie fue distinta, con diferentes especies dominantes. En la dieta de *R. arenarum* los géneros más abundantes fueron *Nitzschia* sp. y *Achnanthydium* sp. que representaron casi el 40% de la composición de la dieta (Figura 29). Sin embargo, en la dieta de *H. cordobae* además de los géneros mencionados para *R. arenarum*, fueron predominantes *Navicula* sp., *Euglena* sp., Cianobacterias filamentosas y ciliados.

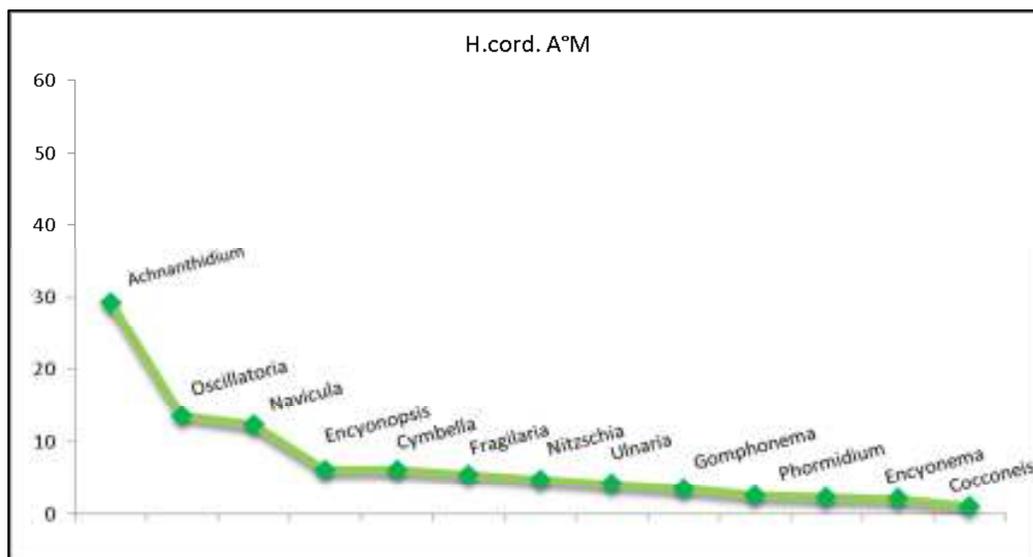


**Figura 29.** Diagrama de rango abundancia para la proporción (Pi) de los ítems alimenticios de larvas de *R. arenarum* e *H. cordobae* del sitio Piletas de decantación.

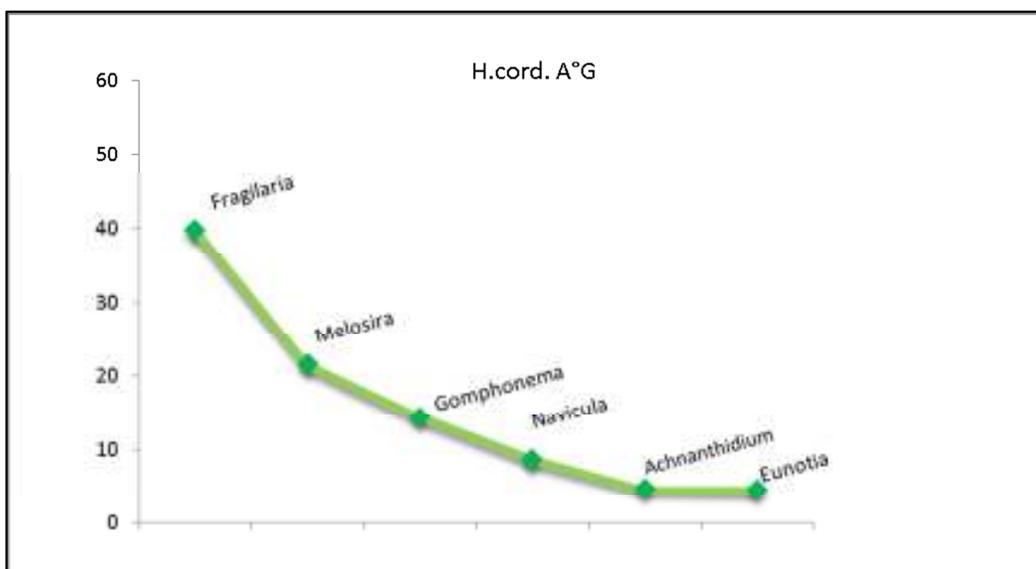
En la muestra de *H. cordobae* de los arroyos que circulan sobre roca metamórfica el 30% de la dieta era únicamente representantes del género *Achnantheidium* sp. y el resto de los géneros se encontraban por debajo del 15% (Figura 30 A). Mientras que en las muestras de *H. cordobae* de los arroyos que circulan sobre roca granítica el 60 % estaba representada únicamente por los géneros *Fragilaria* sp y *Melosira* sp y el resto de los géneros con una representación por debajo del 15 % (Figura 30 B).

Los atributos estructurales de la comunidad de algas que consumen los renacuajos fueron evaluados aplicando el método de rarefacción. En el sitio las Piletas de decantación, la abundancia de ítems consumidos por las dos especies mostró diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $H= 6,56$ ;  $p< 0,01$ ). Los renacuajos de *H. cordobae* consumen una mayor abundancia de algas que *R. arenarum*.

A)



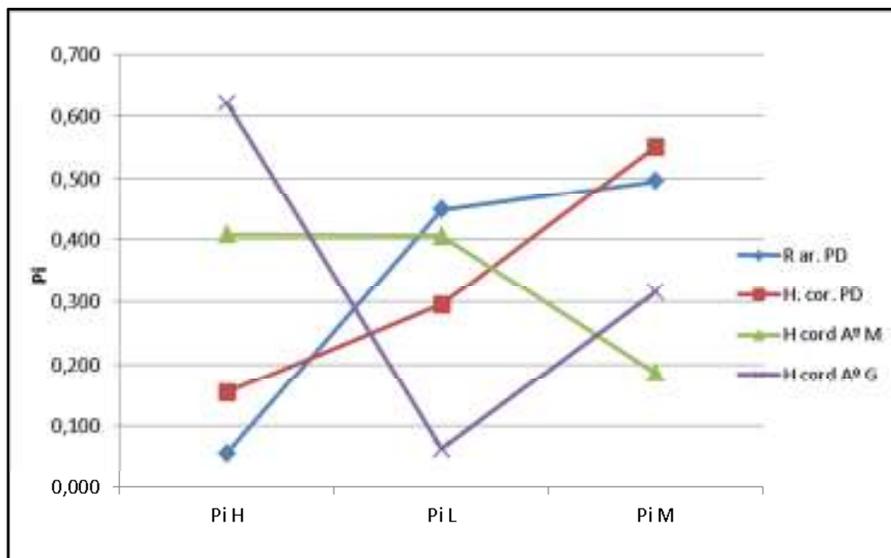
B)



**Figura 30.** Diagrama de rango abundancia para la proporción ( $P_i$ ) de los ítems alimenticios de larvas de *H. cordobae* de A) los arroyos que circulan sobre roca metamórfica (A°M) y de B) los arroyos que circulan sobre roca granítica (A°G).

La diversidad y riqueza en la dieta entre especies para el sitio las Piletas de decantación mostraron diferencias significativas (diversidad,  $F_{1, 11} = 24,32$ ;  $p < 0,01$  y riqueza  $F_{1, 11} = 7,01$ ;  $p < 0,05$ ) con un mayor número de especies consumidas por los renacuajos de *H. cordobae*. Estos atributos también fueron comparados entre los renacuajos de los arroyos que circulan sobre roca metamórfica con los de roca granítica mostrando diferencias significativas (diversidad,  $F_{1, 11} = 1022,32$ ;  $p < 0,0001$  y riqueza  $F_{1, 11} = 22,90$ ;  $p < 0,001$ ) siendo los renacuajos del primer sitio los que consumen una mayor diversidad de algas.

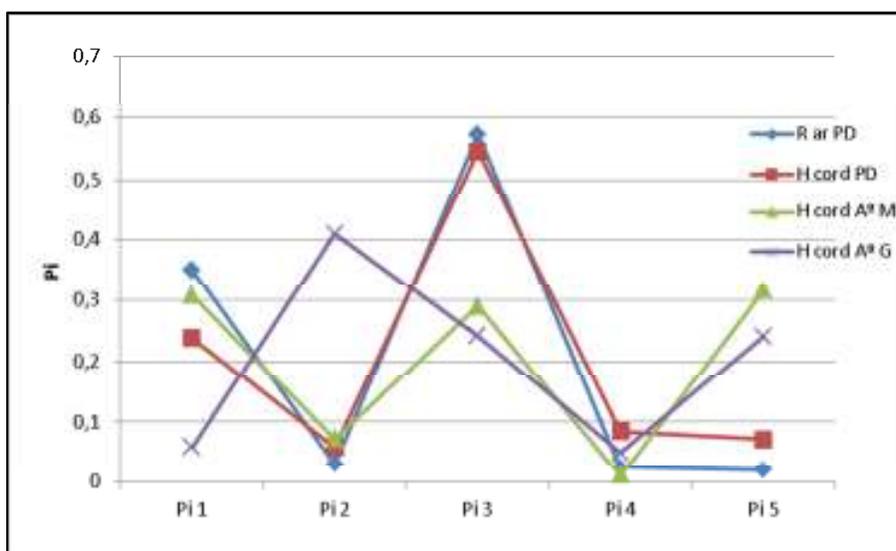
La proporción de individuos de cada gremio en la dieta de las dos especies fue diferente en el sitio las Piletas de decantación ( $F_{2, 15} = 3,91$ ;  $p < 0,05$  para *H. cordobae* y  $F_{2, 15} = 25,12$ ;  $p < 0,0001$  para *R. arenarum*, Figura 31), con una mayor proporción de organismos móviles y de bajo perfil en *H. cordobae* y *R. arenarum*. Sin embargo, para los renacuajos de *H. cordobae* de los arroyos que circulan sobre roca granítica la densidad de organismos móviles fue mayor ( $F_{1, 11} = 11,15$ ;  $p < 0,05$ ) al igual que los ítems clasificados como alto perfil ( $F_{1, 11} = 8,10$ ;  $p < 0,05$ ), mientras que para el bajo perfil la diferencia entre arroyos no fue significativa ( $F_{1, 11} = 3,24$ ;  $p = 0,10$ ).



**Figura 31.** Proporción de cada gremio morfológico para las larvas de *R. arenarum* (*R. ar.*) e *H. cordobae* (*H. cor.*) de las Piletas de decantación (PD) y de arroyos metamórficos (A°M) y graníticos (A°G). Pi H: proporción del gremio morfológico alto perfil; Pi L: proporción del gremio morfológico bajo perfil, Pi M: proporción del gremio morfológico móvil.

La dieta de *R. arenarum* mostró una mayor abundancia de los taxones de clases de tamaño 1 y 3 (Kruskal-Wallis,  $H = 20,02$ ;  $p < 0,01$ ); mayor proporción de clase 3 (60%), seguido por los organismos de tamaño 1 (30%) ( $F_{4, 25} = 80,37$ ;  $p < 0,001$ ). Se encontraron resultados similares para la dieta de *H. cordobae*, con mayor abundancia de organismos de las clases de tamaño 1 y 3 (Kruskal-Wallis,  $H = 19,05$ ;  $p < 0,001$ ), representando estas clases de tamaño (1 y 3) alrededor del 80% de la dieta. En el caso de las larvas de Los arroyos que circulan sobre roca metamórfica el consumo más abundante y de manera semejante fue de taxones de tamaños 1, 3 y 5 que en proporción representan casi el 90 % de los géneros consumidos (Figura 32). Mientras que en arroyos que circulan sobre roca granítica el mayor consumo fue de algas de un biovolumen 2 que representa casi un (25%) del total consumido seguido del biovolumen 3 y 5.

La proporción de las clases de tamaño de algas consumidas entre los renacuajos de *H. cordobae* de los arroyos, mostro que son muy diferentes; esta relación es inversa para todas las clases entre larvas de arroyos metamórficos y larvas de arroyos graníticos. Aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa  $p > 0,05$ .



**Figura 32.** Tamaño de las algas consumidas por las larvas de *R. arenarum* e *H. cordobae* del sitio Piletas de decantación (PD) y Arroyos sobre roca metamórfica (A°M) y arroyos sobre roca granítica (A°G). Pi 1: proporción tamaño algal 1; Pi 2: proporción tamaño algal 2; Pi 3: proporción tamaño algal 3, Pi 4: proporción tamaño algal 4, Pi 5: proporción tamaño algal 5.

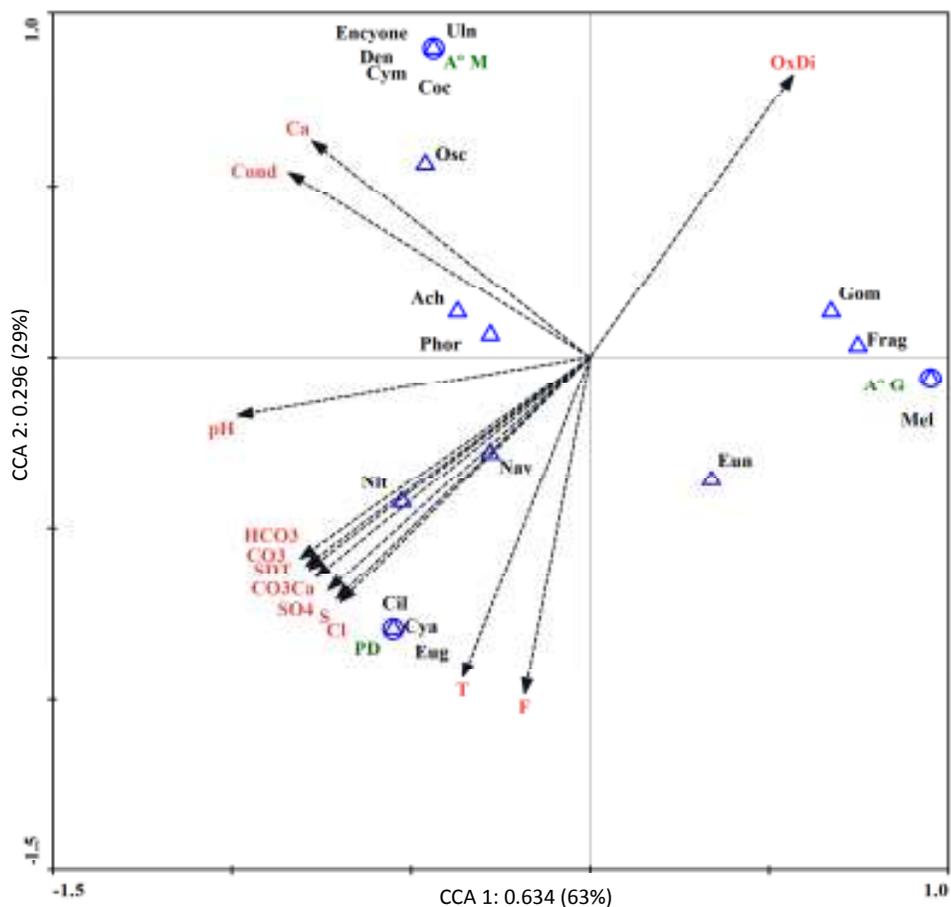
La superposición del nicho general de las dos especies en las Piletas de decantación fue alta ( $GO = 0,964$ ) y en cuanto al solapamiento específico *R. arenarum* superpuso de forma intermedia a *H. cordobae* ( $SO = 0,612$ ), mientras que *H. cordobae* presentó un solapamiento bajo en la dieta de *R. arenarum* ( $SO = 0,187$ ).

Finalmente podemos mencionar que las larvas de los arroyos consumen mayor cantidad de ítems alimenticios comparados con las de las Piletas de decantación, esto se correlaciona con el análisis cualitativo de las muestras de vegetación, guijarros y sedimentos donde muestra que los arroyos presentan mayor riqueza comparado con las Piletas de decantación en cuanto al perifiton.

#### 4.5. Variables ambientales versus ecología trófica de larvas

El análisis de correspondencia canónica (CCA) indicó que la inercia acumulada de la relación entre los parámetros del agua y las algas fue del 90 %. El primer plano factorial recoge el 63, 4% de la inercia total de CCA, es suficiente para resumir la información sobre la relación entre los parámetros del agua y la abundancia de taxones ( $P_i > 1\%$ ) registrados en la dieta de las larvas de *H. cordobae* de, arroyos que circulan sobre roca metamórfica, arroyos que circulan sobre roca granítica y de las Piletas de decantación.

El TRIPLLOT (Figura 33) muestra que el primer eje separa los arroyos que corren sobre roca granítica (A°G) de los arroyos que circulan por roca metamórfica (A°M) y las Piletas de decantación (PD), mientras que el segundo eje separa al A°M del A°G y PD. Colocando cada sitio en un cuartil diferente (Figura 33). El oxígeno disuelto (OxiDi) tiene una relación inversa con el resto de los parámetros del agua. A°G se asoció con los géneros de algas *Gomphonema* sp (Gom), *Fragilaria* sp (Frag) y principalmente con *Melosira* sp (Mel). A°M se asoció principalmente con los taxones algales *Cocconeis* sp, *Cymbella* sp, *Denticula* sp, *Encyonema* sp y *Ulnaria* sp. Mientras que el sitio artificial Piletas de decantación se asoció fuertemente a los taxones *Euglena* sp, *Cyanobacterias* y *Ciliados*.

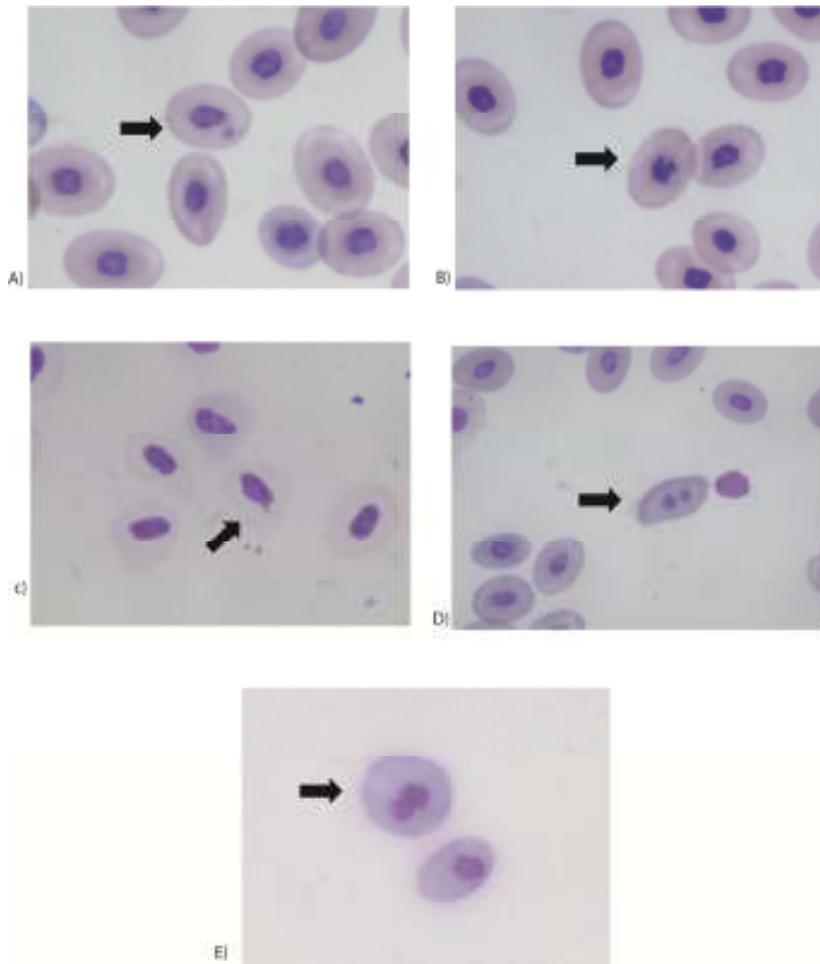


**Figura 33.** Triplot donde se muestran sitios (○), taxones más abundantes registrados en la dieta de larvas (Δ: Eug- *Euglena* sp, Cya- *Cyanobacteria* sp, Cil- *Ciliado* sp, Nav- *Navicula* sp, Nit- *Nitzschia* sp, Phor- *Phormidium* sp, Ach- *Achnanthydium* sp, Osc- *Oscillatoria* sp, Coc- *Cocconeis* sp, Cym- *Cymbella* sp, Den- *Denticula* sp, Encyone- *Encyonema* sp, Uln- *Ulnaria* sp, Gom- *Gomphonema* sp, Frag- *Fragilaria* sp, Mel- *Melosira* sp, Eun- *Eunotia* sp), y los parámetros de agua (las flechas representan la correlación de las variables físicas con los ejes canónicos): Carbonato -CO<sub>3</sub>, Bicarbonato -HCO<sub>3</sub>, SDT- Sólidos disueltos totales, CO<sub>3</sub> Ca- Bicarbonato de calcio, SO<sub>4</sub>-Sulfato, S- Salinidad, Cl- Cloro, Ca- Calcio, Cond- Conductividad, OxiDi- Oxígeno disuelto.

#### 4.6. Biomarcadores Genotóxicos

##### *Test de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares Eritrocitarias*

En sangre periférica de *R. arenarum* e *H. cordobae* los núcleos en posición central de forma elíptica, de contornos definidos corresponden a eritrocitos normales. Mientras que por efecto de algún agente genotóxico se observaron alteraciones en la morfología nuclear, cuantificándose eritrocitos micronucleados (Figura 34 A), escotados (Figura 34 B), brotados (Figura 34 C), binucleados (Figura 34 D) y globulares (Figura 34 E). Los resultados son expresados como frecuencias de micronúcleos (‰ MN) y de anormalidades nucleares (‰ ANE). En el caso de las anormalidades nucleares también se expresan como el valor medio de la sumatoria de todas las anormalidades registradas.



**Figura 34.** Eritrocitos de sangre periférica de *R. arenarum* e *H. cordobae*. A) Eritrocito micronucleado B) Eritrocito escotado C) Eritrocito brotado D) Eritrocito binucleado E) Eritrocito globular. Las flechas indican el eritrocito anormal. 100X

#### **4.6.1. *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867)**

##### **4.6.1.1. Larvas**

Larvas de esta especie solo se recolectaron en las Piletas de decantación. La frecuencia de MN de 10 individuos analizados fue de  $0,50 \pm 0,56$  mientras que las ANE mostraron frecuencias mayores  $14,21 \pm 3,63$ . Como estos resultados no tenían comparación con los demás sitios, se realizó una experiencia en el laboratorio con agua de los sitios para registrar el efecto sobre las larvas de *Rhinella arenarum* (ver sección 4.10)

##### **4.6.1.2. Adultos**

En la Tabla 10 se presentan los valores medios de la frecuencia de micronúcleos (MN) y anormalidades nucleares (ANE) de 20 individuos adultos por sitio. La influencia del sexo sobre estos biomarcadores fue evaluada pero no mostro diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), por lo tanto los análisis siguientes fue realizado combinando machos y hembras como una sola muestra.

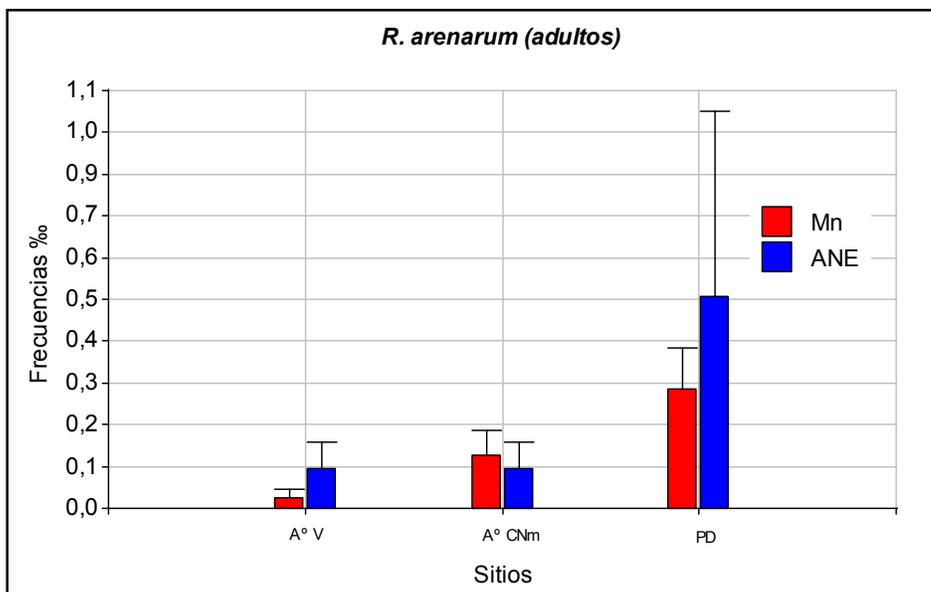
La frecuencia de MN no se diferenció estadísticamente entre sitios (K-W,  $H=2,80$   $p= 0,054$ ). Aunque podemos observar que la población de sapos de las Piletas de decantación es la que presenta mayor frecuencia de micronúcleos (Tabla 10, Figura 35).

En cuanto a las ANE, estas mostraron diferencias significativas entre sitios (Kruskal-Wallis  $H=10,79$ ;  $p < 0,01$  Tabla 10, Figura 35) con frecuencias medias mayores que la de MN siendo los individuos de las Piletas de decantación y arroyo Los Cerros Negros mina quienes presentaron las frecuencias mayores. La anormalidad denominada escotada mostro siempre frecuencias mayores que las demás en todos los sitios analizados (Tabla 10).

**Tabla 10.** Frecuencia media de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de adultos de *Rhinella arenarum* en cada uno de los sitios de muestreo.

Sitio	% MN	% Anormalidades Nucleares (ANE)				
		Escotado	Binucleado	Brotado	Globular	ANE totales
A°V	0,03 ± 0,11	2,48 ± 2,05	0,03 ± 0,11	0,43 ± 0,84	1,85 ± 1,36	4,79 ± 3,19 **
A°CNm	0,14 ± 0,28	4,70 ± 3,27	0,0 ± 0,0	1,27 ± 1,60	2,95 ± 2,18	11,34 ± 7,19
PD	0,30 ± 0,48	6,16 ± 3,27	0,11 ± 0,22	1,15 ± 1,58	4,36 ± 3,20	8,80 ± 5,80

A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNm = arroyo Los Cerros Negros mina; PD = Piletas de decantación; MN = micronúcleos. \*\*p<0,01



**Figura 35.** Gráfico de barras para la frecuencia de micronúcleos (MN), anomalías nucleares eritrocitarias (ANE) en adultos de *R. arenarum* en cada sitio de muestreo. A° V = arroyo Los Vallecitos; A° CNm = arroyo Los Cerros Negros mina; PD = Piletas de decantación.

#### 4.6.2. *Hypsiboas cordobae* (Barrio, 1965)

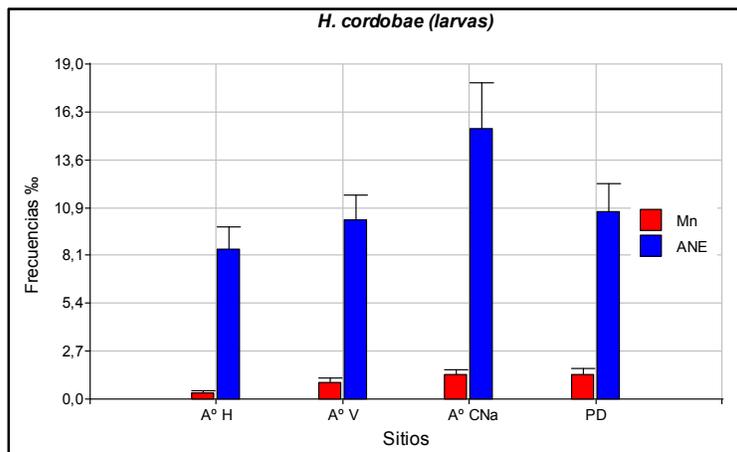
##### 4.6.2.1. Larvas

Alrededor de 20 larvas en cada uno de los sitios fueron analizadas. La frecuencia de micronúcleos mostro diferencias entre sitios (Kruskal-Wallis,  $H= 11.14$ ;  $p<0.01$ , Tabla 11), con una mayor frecuencia de MN en las larvas del sitio las Piletas de decantación, seguida de las larvas del arroyo Los Cerros Negros antes de la mina (Figura 36). Las anomalías nucleares totales no fueron diferentes entre sitios (Kruskal-Wallis,  $H = 6.38$ ;  $p =0.09$ ).

**Tabla 11.** Frecuencia media de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de larvas de *Hypsiboas cordobae* en cada uno de los sitios de muestreo.

Sitio	n	% MN	Anormalidades Nucleares (ANE)				ANE totales
			Escotado	Binucleado	Brotado	Globular	
A° H	20	0,32 ± 0,51**	4,60 ± 2,66	0,30 ± 0,53	0,49 ± 0,91	3,15 ± 3,36	8,53 ± 5,64
A° V	20	0,90 ± 1,36	6,40 ± 3,65	0,34 ± 0,57	0,05 ± 0,21	3,35 ± 3,18	10,14 ± 6,49
A° CNm	17	1,42 ± 1,09	7,45 ± 6,70	0,39 ± 0,66	0,95 ± 1,50	6,51 ± 4,35	15,32 ± 10,90
PD	20	1,40 ± 1,35	6,15 ± 5,33	0,43 ± 0,78	0,11 ± 0,28	3,96 ± 2,56	10,66 ± 7,04

A°H= arroyo las Hylas; A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNm = arroyo Los Cerros Negros mina; PD = Piletas de decantación; n=Tamaño de la muestra; MN = micronúcleos; % = Frecuencia en mil. \*\*  $p < 0,01$ .



**Figura 36.** Gráfico de barras para la frecuencia de micronúcleos (MN) y anomalías nucleares (ANE), en larvas de *H. cordobae* en cada sitio de muestreo.

A° H = arroyo Las Hylas; A° V= arroyo Los Vallecitos; A° CN= arroyo Los Cerros Negros antes y PD = Piletas de decantación.

#### 4.6.2.2. Adultos

En la Tabla 12 se presentan los valores medios de la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares de alrededor de 20 individuos adultos por sitio. La influencia del sexo sobre estas variables fue evaluada pero no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) para ningún sitio, por lo tanto en los análisis siguientes la muestra fue la sumatoria de machos y hembras.

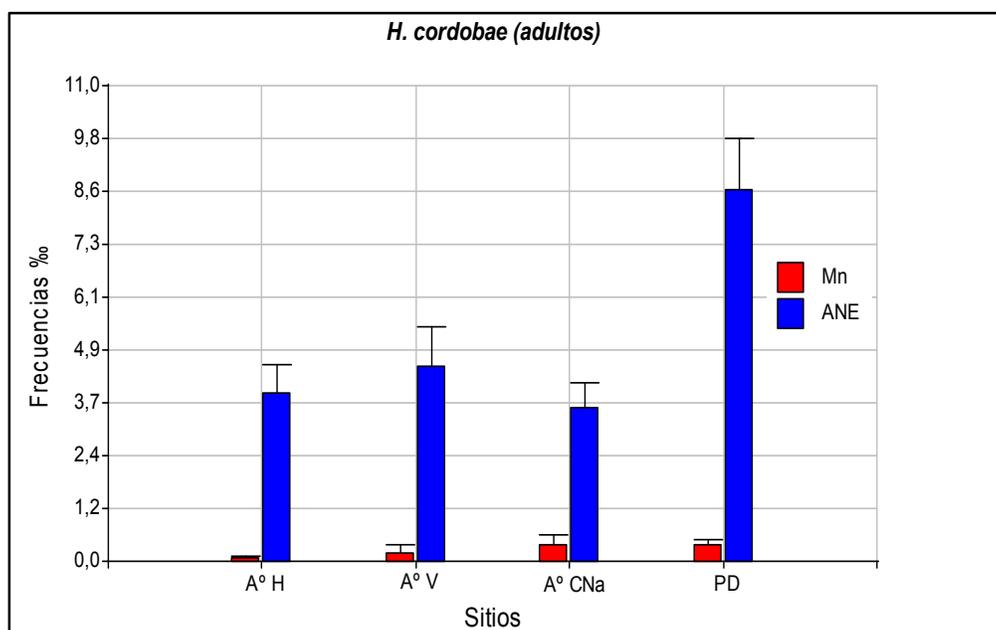
**Tabla 12.** Frecuencia media de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de adultos de *Hypsiboas cordobae* en cada uno de los sitios de muestreo.

Sitio	% MN	% Anormalidades Nucleares (ANE)				
		Escotado	Binucleado	Brotado	Globular	ANE totales
A°H	0,08 ± 0,20	1,62 ± 1,66	0,14 ± 0,30	0,07 ± 0,24	2,08 ± 1,63	3,91 ± 2,85
A°V	0,29 ± 0,67	2,84 ± 2,24	0,08 ± 0,25	0,12 ± 0,31	2,04 ± 1,28	5,07 ± 3,30
A°CNa	0,39 ± 0,85	1,30 ± 1,05	0,09 ± 0,23	0,16 ± 0,32	2,01 ± 1,78	3,56 ± 2,08
PD	0,38 ± 0,58	4,28 ± 3,12	0,08 ± 0,24	1,05 ± 1,34	3,19 ± 1,83	8,60 ± 5,34**

A°H = arroyo Las Hylas; A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNa = arroyo Los Cerros Negros antes de la mina; PD = Piletas de decantación; % = Frecuencia en mil. \*\*  $p < 0,05$ .

La mayor frecuencia de micronúcleos la presentan los individuos de las Piletas de decantación y arroyo Los Cerros Negros antes de la mina, seguido de arroyo Los Vallecitos y por último los individuos del arroyo Las Hylas, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Kruskal-Wallis,  $H= 2,64$ ;  $p= 0,18$ . Figura 37).

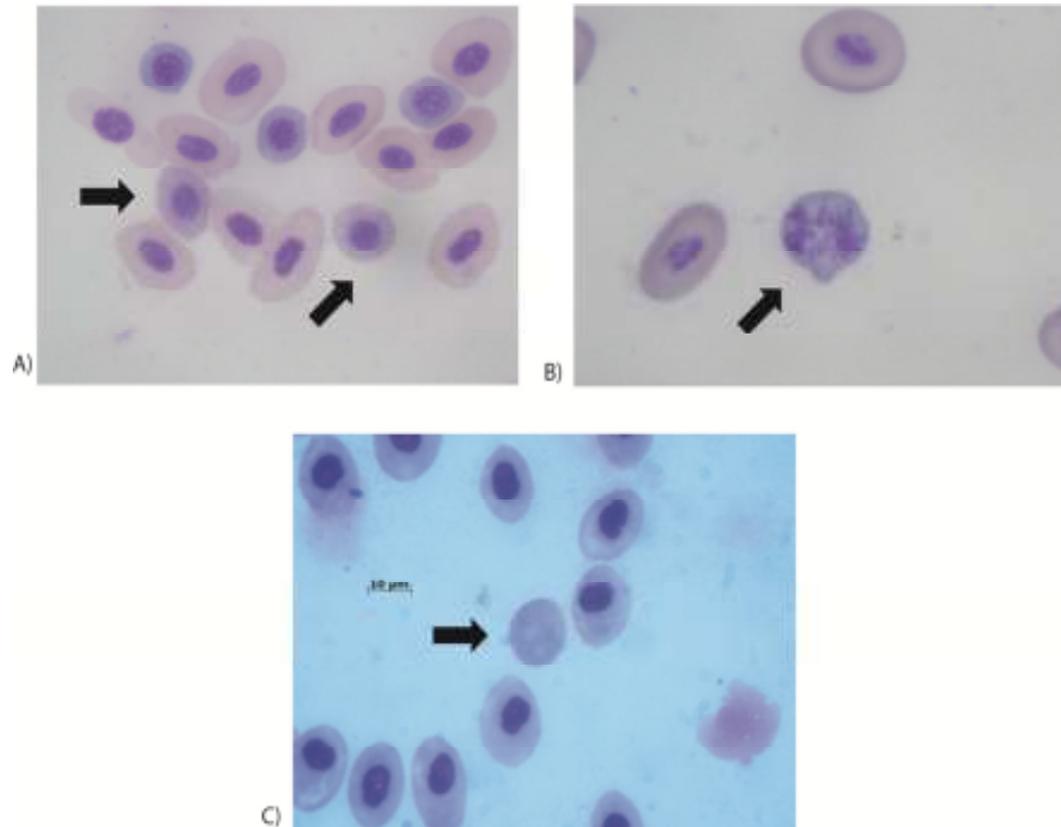
En cuanto a las anomalías nucleares totales, estas mostraron diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $H= 15,11$ ;  $p< 0,001$ ) al compararlas entre sitios. Siendo los individuos de las Piletas de decantación quienes se diferenciaron de los demás sitios. Dentro de las anomalías nucleares (Tabla 11) el tipo escotado y globular son las que aparecen con mayor frecuencia en todos los sitios.



**Figura 37.** Gráfico de barras para la frecuencia de micronúcleos (MN), anomalías nucleares eritrocitarias (ANE) en adultos de *H. cordobae* en cada sitio de muestreo. PD= Piletas de decantación; A°H = arroyo Las Hylas; A°V = arroyo Los Vallecitos; A° CNa= arroyo Los Cerros Negros antes de la mina.

#### 4.7. Biomarcadores Citotóxicos

En la Figura 38 se muestran, eritrocitos inmaduros (Figura 38 A), mitóticos (Figura 38 B) y anucleados (Figura 38 C) registrados en ambas especies.



**Figura 38.** Eritrocitos de sangre periférica de *R. arenarum* e *H. cordobae*. A) Eritrocito inmaduro, B) eritrocito mitótico y C) eritrocito anucleado. Las flechas indican el eritrocito anormal. 100X

### 4.7.1. *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867)

#### 4.7.1.1. Adultos

La frecuencia de eritrocitos inmaduros (IM), mitóticos (M) y anucleados (An) no mostraron diferencias al compararlas entre sitios (Kruskal-Wallis IM,  $p= 0,94$ ; M  $p= 0,28$  y An  $p= 0,88$ ; Tabla 13). Aunque, podemos observar que los individuos del arroyo Los Vallecitos mostraron los valores más bajos de eritrocitos inmaduros y los de las Piletas de decantación mayor frecuencia de eritrocitos anucleados.

**Tabla 13.** Frecuencias media de eritrocitos inmaduros (IM), mitóticos (M) y anucleados (An) de *R. arenarum*.

Sitio	%o IM	%o M	%o An
A°V	3,83 ± 4,32	0,18 ± 0,82	0,10 ± 0,31
A°CNm	8,80 ± 15,98	0,11 ± 0,29	0,10 ± 0,31
PD	6,16 ± 8,77	0,18 ± 0,39	0,54 ± 2,18

A°V = Arroyo Los Vallecitos, A°CNm= Arroyo Los Cerros Negros mina y PD= Piletas de decantación

### 4.7.2. *Hypsiboas cordobae* (Barrio, 1965)

#### 4.7.2.1. Larvas

En el caso de las larvas las pertenecientes a las Piletas de decantación son las que mostraron valores altos de eritrocitos mitóticos, inmaduros y anucleados (Tabla 14). El arroyo los Cerros Negros antes de la mina fue el sitio que indujo mayor cantidad de eritrocitos inmaduros en los dos estadios larva-adulto (Tabla 14).

#### 4.7.2.2. Adultos

El índice mitótico vario significativamente entre sitios ( $F_{3, 36}=5,19$ ;  $p < 0,001$ ). Los individuos de las Piletas de decantación y el arroyo Los Cerros Negros antes de la mina mostraron valores muy similares, mientras que los valores menores se presentaron en los individuos de los arroyos que circulan por un ambiente con escaso  $F^-$ . Algo similar ocurre con la frecuencia de eritrocitos inmaduros donde los individuos del arroyo Los Cerros Negros fueron los que mostraron valores muy alterados. La cantidad de células anucleadas en sangre periférica fue similar en los adultos de todos los sitios (Tabla 14).

**Tabla 14.** Frecuencia media de eritrocitos inmaduros (IM), mitóticos (M) y anucleados (An) de larvas y adultos de *H. cordobae*.

Sitio	Adultos			Larvas		
	%M	% IM	% An	% M	% IM	% An
A°H	0,11 ±0,43	4,20 ±5,95	0,49±0,89	2,89±2,65	5,01±7,19	3,02 ±3,30
A°V	0,53±0,67	14,51±21,95	0,23±0,27	0,82±1,39	7,69±4,52	2,35±1,84
A°CNm	1,41±1,33	25,23±46,25	0,35±0,68	0,89±1,13	15,33±16,40	4,04±4,40
PD	1,2±1,58	9,4±20,85	0,80 ±1,77	1,83±1,69	13,52±10,27	5,42±6,44

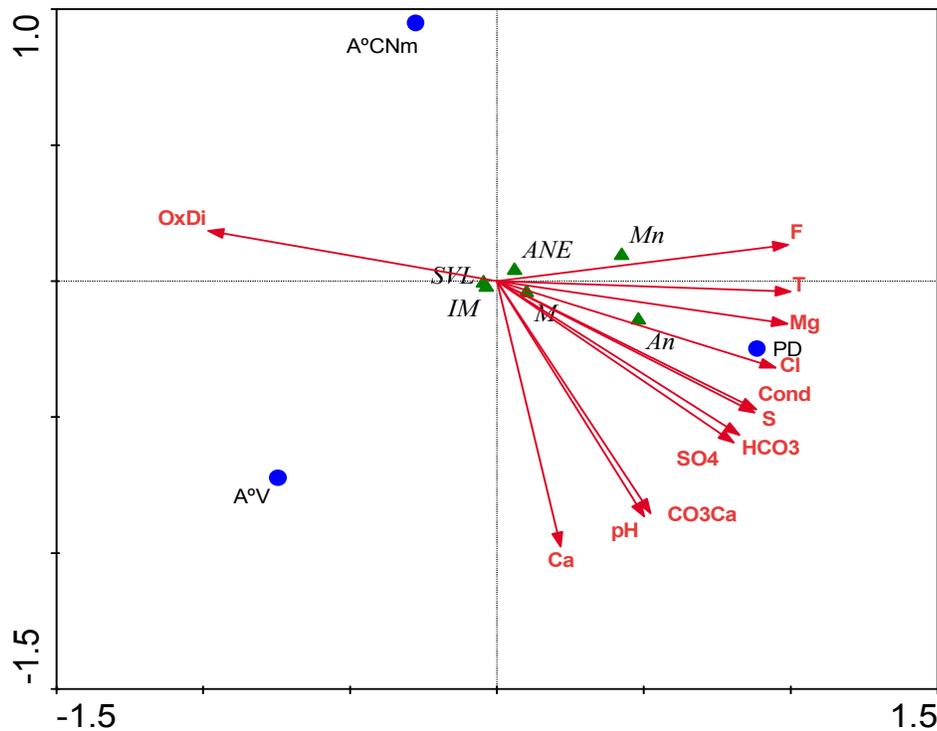
A°H= Arroyo Las Hylas, A°V = Arroyo Los Vallecitos, A°CNm= Arroyo Los Cerros Negros mina; PD= Piletas de decantación % = Frecuencia en mil

#### 4.8. Análisis correspondencia canónica

##### 4.8.1. Adultos de *Rhinella arenarum* versus parámetros del agua y biológicos

El análisis de correspondencia canónica (CCA) relacionando los parámetros del agua con los biológicos en adultos de *Rhinella arenarum* teniendo en cuenta los sitios mostro que la mayor inercia acumulada se da en el primer eje con un porcentaje del 40,9%. Colinealidad se detectó entre la conductividad, la salinidad y solidos disueltos totales (TDS), por lo que TDS fue eliminado del análisis El  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{CO}_3$  se eliminaron del análisis porque no contribuyeron significativamente en un análisis previo.

El TRIPLLOT (Figura 39) muestra que el primer eje separa los sitios A°V y A°CNa del sitio PD. Se observa que el oxígeno disuelto esta inversamente relacionado con el resto de los parámetros del agua. La Pileta de Decantación se relacionó principalmente con el Cloro, asociado con las frecuencias de eritrocitos anucleados y mitóticos. El flúor está relacionado con las Piletas de decantación y con la frecuencia de micronúcleos y en menor medida con las anomalías nucleares eritrocitarias.

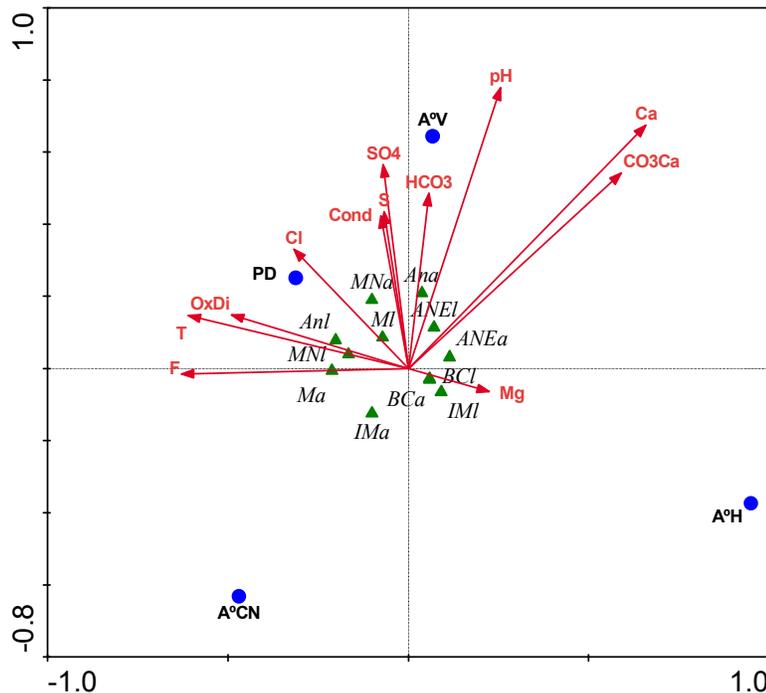


**Figura 39.** Triplot de los sitios, parámetros ambientales y variables biológicas en adultos de *R. arenarum* de los sitios A°V= arroyo Vallecitos; A°CNm= arroyo los Cerros Negros mina; PD= Piletas de decantación. IM= índice mitótico, M= mitosis; MN= micronucleos; An= células anucleadas; ANE= anomalías nucleares eritrocitarias; SVL= largo hocico cloaca.

#### 4.8.2. Larvas y adultos de *Hypsiboas cordobae* versus parámetros del agua y biológicos

El análisis de correspondencia canónica (CCA) indicó que la inercia acumulada de la relación entre los parámetros del agua y las variables biológicas de los renacuajos y adultos de *Hypsiboas cordobae* en el primer eje fue del 49,9 %. Colinealidad se detectó entre la conductividad, la salinidad y solidos disueltos totales (TDS), por lo que TDS fue eliminado del análisis. El  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{CO}_3$  se eliminaron del análisis porque no contribuyeron significativamente en un análisis previo.

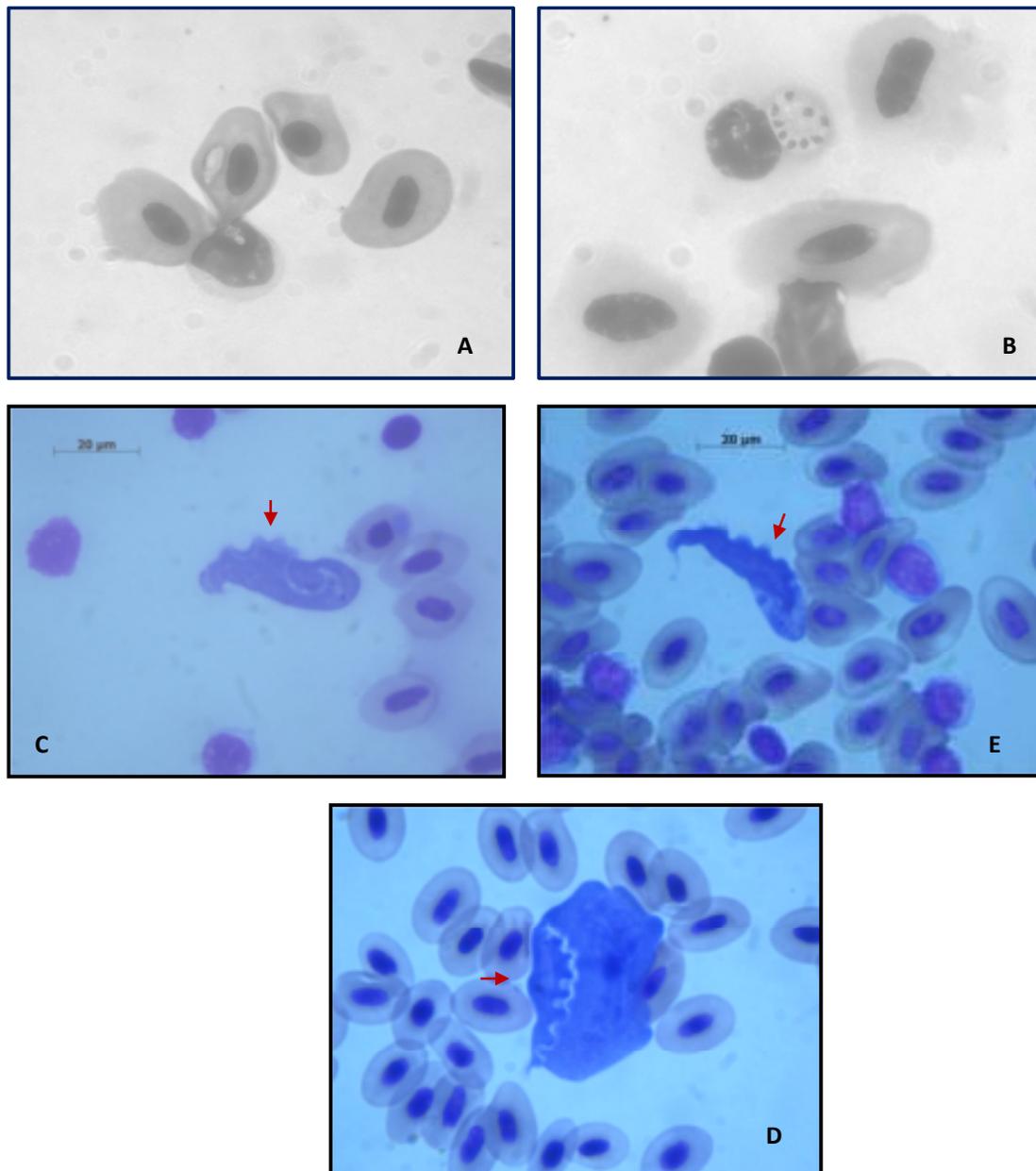
El TRIPLLOT (Figura 40) muestra que el primer eje separa los sitios A°V y A°H de los sitios A°CNa y PD. El magnesio, calcio, pH, y dureza del agua tenían una relación inversa con el resto de los parámetros del agua. La Pileta de Decantación se relacionó con la temperatura del agua y las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{F}^-$  y se asociaron con eritrocitos anucleados y mitóticos en renacuajos mientras que la frecuencia de micronúcleos en renacuajos y adultos de *H. cordobae*. A°H y A°V tenían relación con la concentración y dureza del calcio y estas variables se asociaron principalmente con las anormalidades nucleares de eritrocitos en renacuajos y adultos.



**Figura 40.** Triplot de los sitios, variables ambientales y variables biológicas en adultos y larvas de *H. cordobae*. A°V= arroyo Vallecitos; A°H= arroyo Hylas; A°CN= arroyo los Cerros Negros; PD= Piletas de decantación. IMA índice mitótico adultos, Ma= mitosis adultos; MNa= micronucleos adultos; Ana= células anucleadas adultos; ANEa= anormalidades nucleares eritrocitarias de adultos; BCa= Condición corporal de adultos; IMI= índice mitótico de larvas; MI= mitosis larvas; MNI= micronucleos larvas; Anl= células anucleadas larvas; ANEI= anormalidades nucleares eritrocitarias de larvas; BCI= Condición corporal de larvas

#### 4.9 Hemoparasitos

Se han registrado en los frotis dos tipos de hemoparasitos intra- y extracelulares donde los tripanosomas y apicomplexos y dentro de estos, las hemogregarinas, fueron dentro de los protozoarios que se observaron en los extendidos sanguíneos (Figura 41). De las dos especies estudiadas, *R. arenarum* e *H. cordobae*, solo en esta última se han registrado hemoparásitos.



**Figura 41.** Protozoarios observados en los extendidos de sangre periférica de *H. cordobae*. A) Hemogregarine, B) Forma inmadura con sus 9 merozoitos (100 X) C), D) y E) Morfoespecies de Tripanosomas (40 X). Flechas indican la membrana ondulante.

Con respecto a la parasitemia se puede observar que los individuos del arroyo Las Hylas fue la única que mostro que menos del 3% de sus eritrocitos estaban infectados, mientras que el resto de los individuos analizadas la parasitemia fue grave (Tabla 15).

La intensidad de infección promedio para los hemoparasitos extracelulares fue alta para las mayoría de las poblaciones de *H. cordobae*, quedando fuera de esta clasificación la población de arroyo Las Hylas porque el número de parásitos por cada 100 campos bajo microscopio en 40x fue menor a 3 parásitos (Tabla 16).

La prevalencia de infestación de los hemoparasitos tanto intracelulares como los extracelulares fue menor en el arroyo Las Hylas y mayor en las Piletas de decantación y en arroyo Los Cerros Negros antes de la mina.

**Tabla 15.** Prevalencia e intensidad de infestación de hemoparásitos intracelulares en *H. cordobae*.

Sitio	n	Prevalencia %	Intensidad
A°H	20	35	1,3
A°V	20	85	11,4
A°CNa	14	100	7,4
PD	20	95	8,2

A°H= Arroyo Las Hylas, PD= Piletas de decantación, A°V = Arroyo Los Vallecitos, A°CNa= Arroyo Los Cerros Negros antes de la mina

**Tabla 16.** Prevalencia e intensidad de infestación de hemoparasitos extracelulares en *H. cordobae*.

Sitio	n	Prevalencia %	Intensidad
A°H	20	65	2
A°V	20	85	5
A°CNa	14	93	12
PD	20	100	10

A°H= Arroyo Las Hylas, A°V = Arroyo Los Vallecitos, A°CNa= Arroyo Los Cerros Negros antes de la mina y PD= Piletas de decantación

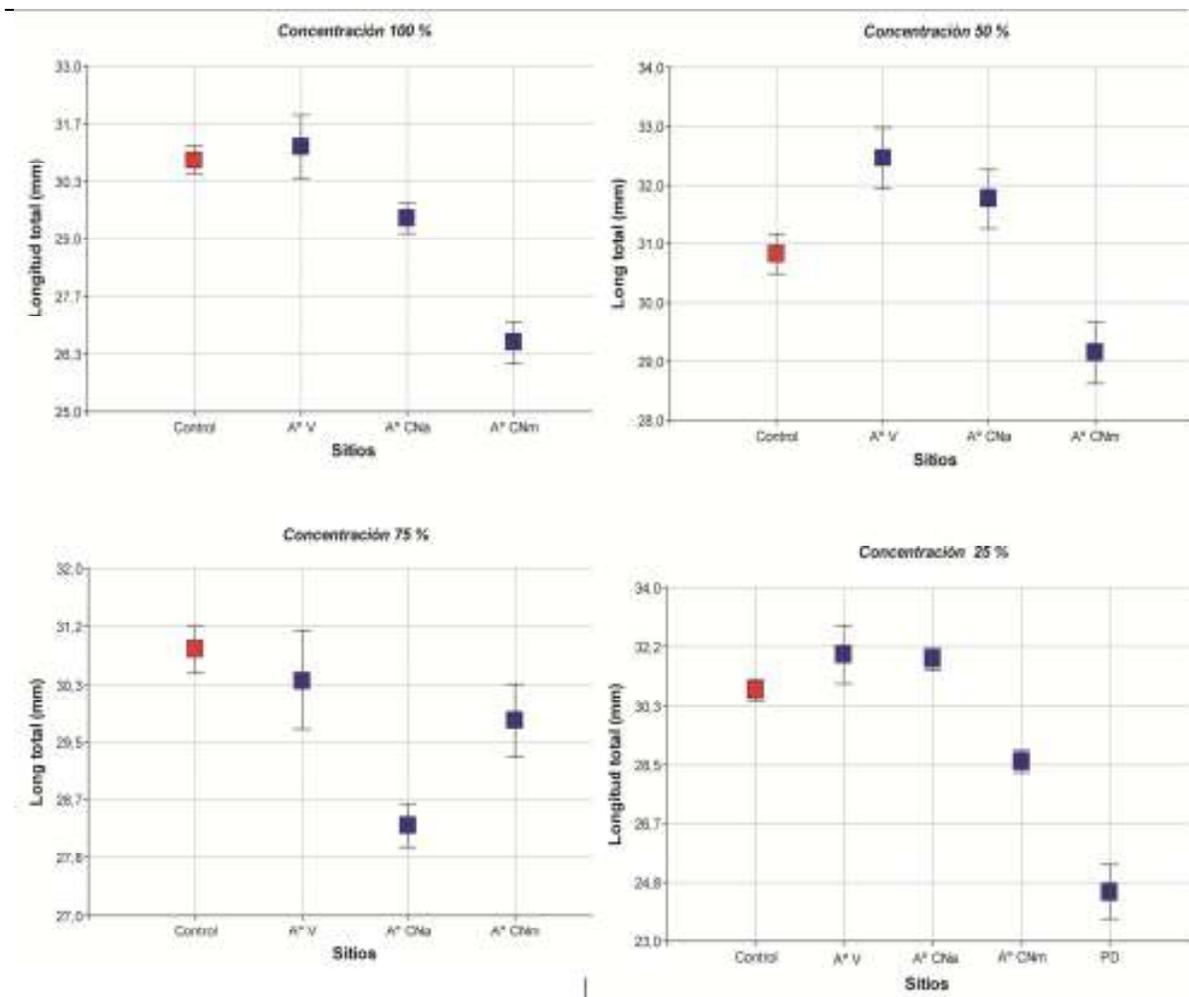
#### **4.10. Trabajo experimental: Prueba de AMPHITOX**

La prueba realizada en el laboratorio (14 días) con agua superficial del sitio las Piletas de decantación con larvas de *R. arenarum* expuestas a tres de las diluciones: 100%, 75% y 50% mostró un 100% de mortalidad de las larvas al cabo de 48 Hs del inicio del ensayo. Mientras que las larvas expuestas a la dilución 25%, mostraron una supervivencia del 100% al finalizar el ensayo. En el control y las muestras de los demás sitios (arroyo Los Vallecitos, arroyo Los Cerros Negros mina y Cerros Negros antes de la mina), la supervivencia fue del 100%. No se registraron anomalías en ninguno de los tratamientos.

En la Figura 42 se muestran las medias de la longitud total en milímetros registrada en cada experiencia. El análisis estadístico mostró diferencias significativas para la concentración 25% ( $F_{4, 15}=25,14$ ;  $p < 0,0001$ ), 50% ( $F_{3, 15}=8,74$ ;  $p < 0,001$ ), 75% ( $F_{3, 14}=4,93$ ;  $p < 0,05$ ) y al 100% ( $F_{3, 15}=18,57$ ;  $p < 0,001$ ). Para la concentración 25% las larvas de las Piletas de decantación registraron la menor longitud, mientras que para las demás concentraciones 50 %, 75% y 100%, la menor longitud la presentaron las larvas del arroyo Los Cerros Negros mina y Cerros Negros antes de la mina.

El análisis estadístico no paramétrico (Kruskal-Wallis) mostró que la frecuencia de micronúcleos, anomalías nucleares e inmaduros no se diferenciaron estadísticamente entre concentraciones ( $p > 0,5$ ) para cada sitio estudiado (Tabla 17). La frecuencia de eritrocitos mitóticos se diferenció entre concentraciones, siendo la concentración 100% la que presentó mayor frecuencia en el arroyo Los Cerros Negros mina ( $p = 0,02$ ). En el caso de los eritrocitos anucleados se encontró diferencias significativas ( $p = 0,03$ ) en el sitio arroyo Los Cerros Negros mina con la muestra al 100%.

Las frecuencias obtenidas en el sitio las Piletas de decantación se comparó para la misma concentración entre sitios (25%); esto, no expresó diferencias significativas inclusive incluyendo al grupo control ( $p > 0,5$ ).



**Figura 42.** Gráfico de puntos para la longitud total de las larvas de *R. arenarum*, de cada una de las concentraciones por sitio. A° V= arroyo Los Vallecitos; A° CNa = arroyo Los Cerros Negros antes; A° CNm = arroyo Los Cerros Negros en la mina y PD= piletas de decantación.

**Tabla 17.** Frecuencia media de micronúcleos (MN), anormalidades nucleares eritrocitarias totales (ANEs), eritrocitos inmaduros (IM), eritrocitos mitóticos y anucleados (An) de larvas de *R. arenarum* expuestas a diferentes concentraciones (Concentr.) en laboratorio.

Sitios	Concentr.	% MN	% ANEs	% IM	% M	% An
<b>Control</b>		0,00±0,00	0.67±0.58	1.33±1.15	3.00 ±2.00	2.67±1.53
	25%	0,25±0,50	3,00±2,00	1,25±1,5	3,25±3,30	4,25±2,50
	50%	0,00±0,00	1,0±0,96	6,0±3,10	4,0±4,32	5,00±1,00
	75%	0,00±0,00	3,0±1,53	5,00±2,52	5,00±1,00	4,00±0,58
	100%	0,70±1,15	5,0±3,61	6,7±1,53	3,7±0,58	5,00±3,00
<b>A°V</b>	25%	0,00±0,0	2,00±1,00	4,33±3,51	1,67±0,58	2,33±1,15
	50%	0,33±0,58	1,67±1,53	8,0±2,65	5,33±2,08	2,00±2,00
	75%	0,00±0,00	2,33±0,58	5,0±4,36	4,67±2,52	2,67±3,79
	100 %	0,33±0,58	2,33±0,58	5,33±0,58	0,00±0,00	8,33±1,53
<b>A°CNa</b>	25%	0,00±0,00	2,60±3,05	4,6±2,51	3,2±4,44	4,2±1,79
	50%	0,20±0,45	1,8±1,30	9,2±6,22	4,8±3,11	2,8±2,77
	75%	0,40± 0,55	4,2 ± 2,17	8,8 ±11,37	4,0 ± 2,74	6,2 ±3,03
	100 %	0,60 ± 0,55	3,8 ± 2,39	15,4 ± 6,19	0,6 ±0,55	10,4±5,13
<b>A°CNm</b>	25 %	0,33±0,58	1,33±0,58	1,67±2,89	4,33±3,51	4,0±2,65

A°V = arroyo Los Vallecitos; A°CNa = arroyo Los Cerros Negros antes; A°CNm = arroyo Los Cerros Negros en la mina PD= Piletas de decantación

## **5. DISCUSIÓN y CONCLUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

Actualmente las herramientas ecotoxicológicas, contribuyen a la integración de los indicadores químicos y biológicos, aportando una visión general en la calidad de un cuerpo de agua. Son especialmente útiles como sistemas de alerta temprana para investigar las causas del deterioro ecológico, lo que permite una mejor comprensión de las relaciones causa-efecto. En este sentido, las respuestas a nivel comunitario y biomarcadores / bioensayos parecen ser claramente complementarias, lo que refuerza la necesidad de combinar los enfoques de diferentes disciplinas para lograr la mejor evaluación de la salud de las comunidades de los ecosistemas. Por otra parte, los organismos acuáticos generalmente están expuestos de manera simultánea a una amplia gama de productos químicos en lugar de las sustancias individuales, lo que resulta sumamente valioso el uso de técnicas ecotoxicológicas no letales para su detección (Martínez Haro *et al.*, 2014).

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

#### 5.1.1. Caracterización de sitios

Actualmente la producción minera de Córdoba se restringe a minerales y rocas industriales, ya que no se registra producción de minerales metalíferos desde fines del siglo XX. En orden de importancia, lideran la producción minera de Córdoba los áridos de origen fluvial y de trituración, seguidos en un orden de magnitud menor por los carbonatos para diversos usos (cemento, cal, molienda) y las arcillas. Sustancias como la serpentinita (esencialmente para uso siderúrgico), cuarzo y feldespato tienen una producción importante, con un fuerte crecimiento en la última década. A pesar de que el volumen producido no es muy alto, Córdoba es líder nacional en la producción de fluorita.

La extracción de fluorita es reducida a una única mina, Los Cerros Negros, un emprendimiento de pequeña a mediana escala. El área donde se encuentra instalada la mina corresponde a un ambiente natural con escasa intervención antrópica. A escala local, el emprendimiento minero, se encuentra instalado en la zona de contacto entre el ambiente litológico metamórfico y granítico. En un primer momento los sitios fueron clasificados teniendo en cuenta el ambientes litológico por el cual discurren los cuerpos de agua: *Metamórficos* (arroyo Las Hylas y arroyo Los Vallecitos), *Graníticos* (arroyo Los Cerros

Negros antes de la mina y arroyo Los Cerros Negros mina) y *Artificial* (Piletas de decantación). Sin embargo, de acuerdo a los resultados presentados, podemos observar que los sitios no solo se separan por su composición litológica (metamórfica y granítica), sino que existen otras características que influyen en la distribución y abundancia de las especies estudiadas como es el caso de la presencia de especies introducidas (trucha) y actividad antrópica que se desarrolla en ese lugar.

Teniendo en cuenta el grado de intervención antrópica los ambientes muestreados pueden dividirse en dos grupos, artificial (Piletas de decantación) y natural (los diferentes arroyos muestreados). Dentro de la clasificación natural tenemos arroyos con diferentes grados de intervención antrópica. Arroyo Las Hylas, Los Vallecitos y Cerros Negros antes, como sitios con escasa a nula intervención antrópica, mientras que con alta intervención tenemos al arroyo Los Cerros Negro mina (Tabla 1).

Durante la caracterización de los sitios se reconocieron especies introducidas como es el caso de la trucha. Las especies de peces exóticas que habitan los arroyos de las sierras de Córdoba son dos: la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*). La primera está incluida en el listado de las 100 especies invasoras más perjudiciales del mundo, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Lowe *et al.*, 2004). Ambas especies son originarias de América del Norte pero se han extendido por todo el mundo. Son voraces y se alimentan de larvas, crustáceos y algunos peces y anfibios. Según Lescano (2014) estas especies introducidas están disminuyendo la población de la ranita trepadora (*Hypsiboas cordobae*) endémica de las sierras de Córdoba. Sumado a las truchas, actualmente en las Piletas de decantación se ha registrado la presencia de *Litobates catesbeianus* (rana toro), otra especie invasora con distribución mundial (Adams y Pearl, 2007) que impacta sobre los anfibios nativos directamente a través de la predación, competencia, introducción de parásitos entre otras (Boone *et al.*, 2004).

Es importante tener en cuenta, que la introducción de especies exóticas invasoras es una de las mayores amenazas que enfrentan actualmente los ecosistemas y especies nativas. Estas especies causan graves daños a los ecosistemas terrestres y acuáticos, provocan desequilibrios ecológicos entre las poblaciones silvestres, cambios en la composición de especies y en la estructura trófica, desplazamiento de especies nativas, pérdida de biodiversidad, reducción de la diversidad genética y transmisión de una gran variedad de enfermedades (Kraus, 2009).

### 5.1.2. Calidad del agua

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

Es bien conocido que los factores físicos o químicos de un ambiente influyen en la toxicidad de un contaminante dado, ya que pueden intervenir en su biodisponibilidad ambiental al afectar su solubilidad en agua, persistencia, afinidad por suelos (Cairns *et al.*, 1975; Hoffman *et al.*, 2003). Esto lleva además a posibles cambios en la acumulación, efecto subletal y letalidad de los tóxicos.

Los niveles de toxicidad de muchos contaminantes dependen principalmente del pH, además de la temperatura (Cairns *et al.*, 1975; Boyd, 1984; Hoffman *et al.*, 2003). Los organismos acuáticos requieren un rango óptimo de pH entre  $6 < \text{pH} < 9$  para el crecimiento y la supervivencia, fuera de este rango, los organismos pueden presentar algún estrés fisiológico (García y Fontúrbel, 2003; Addy *et al.*, 2004; Gauthier *et al.*, 2004). Por lo tanto, un estrés ácido o alcalino puede causar trastornos genéticos en las primeras etapas del desarrollo (Pough y Wilson, 1977). En este estudio, el pH fue diferente entre los sitios, siendo Las Piletas de decantación el sitio que presentó los valores más básicos, cercanos al valor límite óptimo para los anfibios propuesto por Gauthier *et al.*, (2004). Un aumento en los valores de pH en este sitio se debe principalmente a que el lodo que sale finalmente de la planta de flotación presenta valores de pH cercanos a 10 por lo que se agrega ácido clorhídrico para bajar este valor a 7 para que pueda actuar el floculante (*comunic. per. Martínez J. M.*).

En los efluentes de Las Piletas de decantación fueron registrados altas concentraciones de los iones mayoritarios ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{HCO}_3^-$ ), esto podría estar asociado a que durante el proceso de flotación se adicionan ciertos productos químicos como soda cáustica, silicato de sodio, ácido clorhídrico y floculantes.

Las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  registradas (395 mg/l) durante los muestreos exceden a los niveles recomendados por la US Environmental Protection Agency donde indican que la concentración promedio de  $\text{Cl}^-$  no debe superar los 220 mg/l para la protección de la vida acuática (USEPA, 1988). Altas concentraciones de este elemento puede deberse a la

incorporación de ácido clorhídrico al lodo para disminuir el pH como se mencionó anteriormente.

Asociado al  $\text{Cl}^-$  el  $\text{Na}^+$  también siempre mostró valores muy superiores a los recomendados. Las cantidades excesivas de iones cloruro y sodio causan daño en la función y estructura de los ecosistemas (Sanzo y Hecnar, 2006; Collins y Rusell, 2009) ya que se conoce que una exposición prolongada a concentraciones de  $\text{Cl}^-$  sobre 220 mg/l es perjudicial para las especies acuáticas (Kaushal *et al.*, 2005; Collins y Rusell, 2009). Particularmente en los anfibios, se conoce que puede ejercer efectos tóxicos agudos y crónicos por la degradación de la calidad del hábitat, causando anomalías del desarrollo, como el crecimiento y la disminución del tiempo hasta la metamorfosis (Christy y Dickman, 2002; Sanzo y Hecnar, 2006).

De los elementos analizados, el ion  $\text{F}^-$  presentó concentraciones por encima de los límites sugeridos por el Consejo Canadiense de Ministros de Medio Ambiente (0,12 mg/l) (CCME 2002) en todos los sitios. Las concentraciones mayores las presentó el sitio Las Piletas de decantación (14,2 mg/l) seguido por el arroyo Los Cerros Negros (1,9 mg/l) ambos valores se encuentran por encima del valor propuesto por Camargo (2003) para la protección de la biota acuática en ecosistemas de agua dulce (0,5 mg/l) y al valor sugerido por el gobierno Argentino (1,4 mg/l) (Ley 24051, 1992).

Como resultado de la actividad minera el agua asociada a esta actividad incrementa 30 a 40 veces las concentraciones de  $\text{SO}_4^{2-}$  y por lo tanto repercute finalmente en un aumento de alrededor de 10 veces los valores de conductividad y salinidad (Cañedo Arguello *et al.*, 2013). Este fenómeno se registró solo en el sitio artificial (Piletas de decantación) y no en los sitios naturales, lo que confirma que no existe filtración de agua de las Piletas de decantación hacia los arroyos.

Los nitritos y nitratos son compuestos que tienen una acción tóxica sobre los organismos ya que actúan a nivel de los pigmentos respiratorios impidiendo el transporte y liberación del oxígeno (Babini *et al.*, 2015). La no detección de estos iones en ninguno de los sitios muestreados indica que no están bajo efectos de actividad agrícola y ganadera (Camargo y Alonso, 2007; Giuliano Albo y Blarasin, 2013) ya que existe una relación lineal entre la actividad agrícola-ganadera y el aumento de dicho elemento (Ongley, 1997; Langan, 2003).

El arsénico ( $\text{As}^+$ ) generalmente se encuentra asociado con el  $\text{F}^-$  (Rosso *et al.*, 2011). Los efectos tóxicos de arsénico y fluoruro cuando se administra solo han sido ampliamente estudiados y son bien conocidos, pero los efectos biológicos y las posibles interacciones cuando la exposición es simultánea han sido escasamente estudiados, y los resultados de estos estudios son controvertidos (Barbier *et al.*, 2010). La detección de  $\text{As}^+$  con valores muy bajos en los arroyos era esperable, ya que las rocas de la zona de estudio tienen escaso arsénico en su composición, por lo que su aparición en el agua de Las Piletas de decantación se debe a la actividad propia que se realiza en el lugar. Las concentraciones de  $\text{As}^+$  estaban muy por debajo de los límites máximos sugeridos para la protección de la biota acuática en ecosistemas de agua dulce según lo postulado por las autoridades internacionales (0,005 mg/l en Canadá) como nacional (0,015 mg/l).

La salinidad es una medida que hace referencia a la cantidad de iones mayoritarios inorgánicos disueltos en el agua o el suelo ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{HCO}_3^-$ ) y por lo tanto es un componente natural (Williams, 1987). Estos iones disueltos se pueden expresar en términos de corriente eléctrica (Conductividad eléctrica, medida en Siemens por metro). Por lo tanto, la conductividad comúnmente se utiliza como medida de salinidad (Cañedo Arguello *et al.*, 2013). En las aguas continentales, la salinidad puede variar de 10  $\text{mg/l}^{-1}$  a 100  $\text{g/l}^{-1}$  y es un factor importante que limita la distribución de la biota (Cañedo Arguello *et al.*, 2013). De acuerdo a la clasificación realizada por Venice systems (1959) el agua superficial de los sitios muestreados se puede dividir en dos: agua dulce  $<0.5 \text{ g/l}^{-1}$  para todos los arroyos y oligohalinos entre 0,5 - 4,0  $\text{g/l}^{-1}$  para Las Piletas de decantación.

Una alta salinidad influye sobre los organismos de agua dulce, ya que estos, necesitan mantener una presión osmótica interna en relación con el medio en el que viven. Por lo tanto, cuando la concentración de sal del medio se vuelve demasiado alta de los mecanismos osmorregulatorios pueden colapsar terminando en el daño celular y posiblemente la muerte, pero en algunos caso se comprobó que de alguna manera facilita la transmisión de parásitos en el medio acuático (Cañedo Argüelles *et al.*, 2013).

Chambers (2011) en su estudio registró un aumento de los niveles basales de corticosterona en salamandra (*Ambystoma jeffersonianum*) como resultado del aumento de la conductividad, lo que indicaría una respuesta de estrés que podría afectar el crecimiento.

El oxígeno disuelto mostró valores que fueron compatibles con la lectura normal de los anfibios bajo condiciones estándares (oxígeno disuelto  $\geq 60\%$ ) en todos los sitios

analizados (Gauthier *et al.*, 2004). Las Piletas de decantación fue el sitio donde los valores fueron más bajos, quizás esto se deba a la turbidez que presenta el agua impidiendo la colonización de algas y macroalgas, y fundamentalmente a la ausencia de flujo de agua por ser un ambiente lenticó (Esteves, 2011).

La mayor temperatura registrada en Las Piletas de decantación se debe principalmente a que durante el proceso de flotación de la fluorita, el agua es calentada a 28 °C. Esto puede afectar la disponibilidad y efecto tóxico de determinadas sustancias a las cuales pueden estar expuestos los organismos (Hoffman *et al.*, 2003), influyendo también en la disponibilidad del oxígeno disuelto (Palma Acuña, 2005). En los anfibios, la temperatura influye en varias actividades metabólicas, en las tasas de deshidratación e hidratación así como también en la tasa de desarrollo de estos organismos (Duellman y Trueb, 1994) actuando como un potencial estresor ambiental de los primeros estadios de los anfibios (Pough y Wilson, 1977). Además, cambios en la temperatura del ambiente, suele estar asociado a un mayor grado de toxicidad para un contaminante (Hoffman *et al.*, 2003).

Finalmente, los análisis físico-químicos indicaron una mala calidad del agua de las Piletas de decantación, ya que los resultados revelaron concentraciones iónicas que exceden los estándares legales. Las Piletas de decantación mostraron mayor conductividad, salinidad, sólidos disueltos y elevados niveles de sulfato. Sin embargo, encontramos anfibios que habitan este ambiente donde desaguan las aguas de la planta de flotación de la fluorita. Estas aguas con mezclas complejas de sustancias, la interpretación puede ser extremadamente desafiante como resultado de la multitud de posibles interacciones sinérgicas y/o antagónicas, dando lugar a efectos biológicos que no son fácilmente predecibles (Gauthier *et al.*, 2004). Los mecanismos de sinergia química para las mezclas no se entienden completamente, aunque algunas teorías incluyen aumento de la tasa de absorción, formación de metabolitos tóxicos, reducción de la excreción, alteración de la distribución y la inhibición de los sistemas de desintoxicación, que parece ser la teoría más popular (Howe *et al.*, 1998). Probablemente, la elección de este sitio por los individuos de *R. arenarum* e *H. cordobae* se debe a las estrategias reproductivas de estas especies, que prefieren como sitios de ovoposición sitios vegetados con escasa movilidad de corriente e incidencia de luz solar directa (Sanabria *et al.*, 2007). Estas características podrían estar asociadas con una mayor temperatura del agua y un aumento de la disponibilidad de alimento y refugio.

## 5.2. Biomarcador morfológico

De las dos variables que definen la condición corporal de un individuo, solamente el peso, y no la longitud, puede aumentar o disminuir rápidamente en respuesta a un cambio (Reading y Clarke, 1995). La menor condición registrada en los renacuajos que se encuentra en Las Piletas de decantación puede ser consecuencia de la escasez de alimentos, debido a que la disponibilidad de alimentos puede verse afectada por las condiciones ambientales. El análisis cualitativo de las muestras de agua, sedimento y vegetación de Las Piletas de decantación, revelaron que la cantidad de alimento disponible para los renacuajos es muy bajo. De igual manera, algunos estudios han manifestado que independientemente de la cantidad de alimento, los renacuajos pueden tener cierta incapacidad en la adquisición del alimento, la digestión del mismo o la síntesis de nuevos tejidos, debido a la presencia de ciertos contaminantes, condiciones físicas o bien por anomalías morfológicas (Freda y Dunson, 1984; Babini *et al.*, 2015).

La comparación de las medidas biométricas, peso y longitud, en los adultos de Las Piletas de decantación son significativamente más grandes y más pesados, por tanto, tienen valores más elevados de condición corporal que los individuos de los arroyos. Este incremento en la condición corporal no significa que los individuos tengan un mejor estado de salud (Polo Cavia *et al.*, 2010), ya que un hábitat puede inducir diferencias fenotípicas en las poblaciones naturales, resultando en rasgos aparentemente sanos (por ejemplo, un mayor tamaño corporal) que no necesariamente informan el verdadero estado de salud de la población; quizás los individuos de Las Piletas de decantación tienen una condición corporal más alta, debido a que el ambiente presenta temperaturas más cálidas y una mayor disponibilidad de recursos alimenticios. Por otro lado, un hábitat con un aumento de la disponibilidad de alimentos no necesariamente es el apropiado, ya que los individuos pueden estar expuestos a varios factores de estrés como: xenobióticos, parásitos, competidores, presencia humana, entre otros.

En un estudio Gonzalo y Camargo (2012) exponen que un medio acuático con altas concentraciones de fluoruro ha sido reportado como un factor que afecta a la bioacumulación y toxicidad de fluoruro, repercutiendo en la longitud total de los individuos; siendo, los individuos de mayor talla los que presentan una mayor tolerancia que los de menor talla. Esta relación no se ha encontrado en nuestro estudio ya que los

individuos adultos de mayor tamaño (PD y A°CN) eran los que mostraron mayor efecto genotóxico.

Las larvas de *R. arenarum* expuestas en laboratorio a muestras de agua con altos contenidos de flúor, presentaron menor longitud total que los individuos de los arroyos con bajo contenido de flúor. Es decir que este elemento está actuando como un inhibidor en el crecimiento a medida que aumenta su concentración (Chai *et al.*, 2016). El tamaño final de los individuos es muy importante, porque repercute en la población de adultos, ya que poblaciones con individuos en promedio más pequeños tienen mayores probabilidades de declinaciones, que las compuestas por individuos de tamaños grandes (Gray y Smith, 2005).

Las malformaciones registradas en poblaciones naturales han sido consideradas normales hasta un 5 % (Barrio *et al.*, 2009). Las investigaciones en los últimos años han informado que son tres los posibles causantes de las malformaciones observadas en los anfibios: contaminantes, radiación ultravioleta y parásitos trematodos (Blaustein y Johnson, 2003; Ankley *et al.*, 2004), aunque el origen es complejo, frecuentemente se propone a una sinergia, entre ellos (Meteyer, 2000).

En este estudio se registró en el arroyo Cerros Negros mina un porcentaje de anomalías morfológicas en individuos adultos que supera ampliamente el valor de referencia (21%). Mientras que en Las Piletas de decantación el porcentaje de individuos fue mayor que el nivel de referencia pero menor que en Los Cerros Negros (CNm). La mayor frecuencia de individuos con alguna anomalía morfológica podría estar relacionada en el sitio Los Cerros Negros mina con las altas concentraciones de flúor mientras que en Las Piletas de decantación con las altas concentraciones de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{F}^-$ . Sanzo y Hecnar (2006) demostraron que las larvas de *Rana sylvatica* expuestas a concentraciones de NaCl mayores a 220 mg/l producen un deterioro general en las individuos con un menor peso y anomalías morfológicas como colas desviadas. Resultados similares fueron encontrados por Karraker, (2007) al exponer embriones de *Rana clamitans* a altas concentraciones de sal (NaCl).

La menor longitud total registrada en las larvas de *H. cordobae* en Las Piletas de decantación podría deberse a las altas concentraciones de flúor registradas en este sitio, ya que este parámetro es muy sensible a las concentraciones de flúor (Goh y Neff, 2003; Chai *et al.*, 2016). Esto podría aumentar la susceptibilidad a la depredación (Alford, 1999)

además, con escasa disponibilidad de recursos, estos renacuajos posiblemente requieren más tiempo para metamorfosear. En este sentido, Chai *et al.*, (2016) informó que en condiciones de laboratorio por encima de 4,1 mg F/l inhibe significativamente el crecimiento de los embriones, retarda la metamorfosis, disminuye el tamaño a la metamorfosis y aumenta el número de embriones malformados en *Rana chensinensis*. Goh y Neff (2003) registraron resultados similares, al aplicar el ensayo-Xenopus (FETAX) para evaluar los efectos de la fluorita sobre el desarrollo de embriones de rana. Estas observaciones mostraron claramente que el fluoruro es un teratógeno que afecta el desarrollo normal de los embriones de rana. El F<sup>-</sup> ha sido informado como un inhibidor enzimático y agente oxidante (Barbier *et al.*, 2010) por lo tanto, es probable que las anomalías morfológicas registradas en larvas y quizás también en adultos sea una consecuencia de interrupciones en los procesos metabólicos de los estadios iniciales.

Un aumento significativo en la frecuencia de larvas de *Hypsiboas cordobae* con algún tipo de anomalía se registró en Las Piletas de decantación. La anomalía que mayor porcentaje presentó fue larvas con ausencia de pigmentación, seguida de la anomalía, intestino enroscado en dos espirales diferentes. Este tipo de despigmentación es conocida como albinismo parcial (Klug y Cummings 1999) o leucismo (Bechtel 1995), términos utilizados para hacer referencia a los animales con pigmentación anormal, pero con color normal de los ojos. Un cambio en la pigmentación en larvas podría estar relacionado con cambios en la temperatura y etapa de desarrollo (Duellman y Trueb, 1986). Sin embargo, otros autores han asociado esta anomalía en larvas a las condiciones ambientales del sitio como respuesta al ambiente y a la plasticidad ontogénica (Alho *et al.*, 2010). A pesar de que los cambios en la coloración no están muy claros, algunos autores argumentan que esta condición podría ser favorecida por los disturbios del ambiente principalmente por la contaminación lumínica (Martinuzzi *et al.*, 2016). Este tipo de contaminación podría estar explicando el alto porcentaje de individuos des pigmentados registrados en las Piletas de decantación ya que la luz puede actuar a nivel en la producción de melanina (Buchanan *et al.*, 2008; Perry *et al.*, 2008).

Es importante registrar los cambios en la coloración ya que pueden ser llevados a la fase adulta (Alho *et al.*, 2010), lo cual podría verse afectadas algunas de las funciones de las melaninas y carotenoides, compuestos pigmentarios responsables de la variación en la coloración animal. Por lo tanto, se ha sugerido que la pigmentación está implicada en una amplia gama de funciones adaptativas, como: la señalización, la crisis, termorregulación, la

radiación ultravioleta, así como también la función inmune (Vences *et al.*, 2002; Jedor y Breitwisch, 2003; Alho *et al.*, 2010; Polo Cavia y Gómez Mestre 2017).

Debido a las características de los ambientes muestreados en este estudio, la contaminación por flúor podría ser mencionada como probablemente la principal causa de anomalías. Sin embargo, en las Piletas de decantación otros iones presentaron valores altos en el agua superficial. Cuando un ambiente presenta en el agua mezclas complejas, la interpretación de los resultados biológicos no son fácilmente predecibles (Gauthier *et al.*, 2004), ya que, los factores de estrés combinados, pueden tener efectos no sólo aditivos o sinérgicos en su impacto acumulativo para el organismo y su población, sino también tender a minimizarlos (Little *et al.*, 2003).

La reducción en el tamaño larval, menor peso corporal y anomalías morfológicas registradas en *H. cordobae* de las Piletas de decantación podrían tener consecuencias ecológicas relacionadas con la demografía poblacional de esta especie, tanto a corto como a largo plazo. Quizás a largo plazo, una tendencia a poblacionales larvales de menor tamaño, de lugar a poblaciones de adultos con una talla menor, lo cual pueda repercutir en la supervivencia y persistencia poblacional. Estos resultados podrían ser complementados con estudios acerca de la longevidad poblacional y al *fitness* reproductivo.

### **5.3. Biomarcadores de comportamiento trófico en Larvas**

El análisis de la arquitectura del perifiton consumido por las especies, demostró que existe un grado de partición de los recursos alimentario. Los renacuajos de *Hypsiboas cordobae* consumen un mayor número de organismos que los de *Rhinella arenarum*. Por otra parte, no hubo diferencias en la proporción de los gremios morfológicos representados en la dieta de cada especie.

El análisis de la dieta de estas especies de larvas de anfibios *R. arenarum* e *H. cordobae* concuerda con las características de los sitios y con Passy (2007) quien encontró que los taxones algales del gremio *bajo perfil* son más frecuentes en ambientes sombreados y/o ambientes pobres en nutrientes, características que se corresponden con Las Piletas de decantación, mientras que los de *alto perfil* son más abundantes en ambientes donde la luz y los recursos no son limitantes como los arroyos analizados en este estudio.

El espectro trófico de los renacuajos fue similar al de otras especies de renacuajos bentónicos y nectónicas, compuestos principalmente de restos de animales, restos de plantas, diatomeas y sedimentos (Lajmanovich y Fernández, 1995; Arana *et al.*, 2003; Echeverría *et al.*, 2007; Bionda *et al.*, 2012, 2013). Sin embargo, las diferencias en el uso de recursos, el tipo y tamaño de las presas consumidas por *R. arenarum* e *H. cordobae* en el sitio Las Piletas de decantación sugiere cómo las especies están estructuradas para coexistir en el mismo entorno.

*Rhinella arenarum* consume mayor proporción de algas móviles, representada principalmente por *Nitzschia* sp. En cambio, en la dieta de *Hypsiboas cordobae* se observó una mayor proporción de algas móviles, representada por *Nitzschia* sp., *Navicula* sp., *Euglena* sp., ciliados y algas de bajo perfil, principalmente por la abundancia de *Achnanthydium* sp.

La dieta en general coincide con la conformación del aparato bucal, cavidad bucofaríngea y al gremio ecomorfológico de las especies (McDiarmid y Altig, 1999). En este sentido, Duellman y Trueb (1986) afirmaron que la partición de los recursos entre las especies de anuros puede deberse a diferencias en su posición en la columna de agua, consecuencia de las adaptaciones morfológicas para la explotación de los microhábitats específicos, clasificando a *R. arenarum* al grupo bentónicos (agrupadas en los restos vegetales que flotan en el cuerpo de agua) e *H. cordobae* a nectónicas (nadan usando toda la columna de agua).

Por otra parte, Rossa Feres *et al.*, (2004), indican que las especies difieren en sus habilidades para ingerir partículas de diferentes tamaños, pero la mayoría son muy eficientes en la extracción de una amplia variedad de tamaños de partículas del agua entrante. Sin embargo, se encontraron con que el tamaño de partícula no explicó la selección de los alimentos. Del mismo modo, en nuestro estudio ambas especies consumieron mayor proporción de pequeñas algas, con menos de  $600 \mu\text{m}^3$  biovolumen, ya que la mayoría de los géneros consumidos, y también los más abundantes en el medio ambiente, corresponden a estas categorías de tamaño (*Navicula* sp., *Nitzschia* sp. y *Achnanthydium* sp.).

Los renacuajos de las especies, *R. arenarum* e *H. cordobae*, coexisten espacialmente (Piletas de decantación) pero con la variación en el uso de nicho trófico. Al analizar el solapamiento del nicho trófico entre las dietas de las especies que coexisten en

las Piletas de decantación se observó que fue en general alta, lo que concuerda con otros estudios (Pavignano, 1990; Rossa Feres *et al.*, 2004).

Un alto grado de sobreposición podría ser debido a la competencia entre las especies por el uso de los recursos comunes y limitada, o la falta de competencia o una estrategia de alimentación no selectiva, por lo tanto los elementos más frecuentes en el medio ambiente serán los elementos más frecuentes en la dieta (Peltzer *et al.*, 2010). Ambos escenarios son posibles y se necesitan más datos sobre la disponibilidad de recursos y las interacciones entre especies para evaluar la competencia trófica (Peltzer *et al.*, 2010). En cuanto al solapamiento específico, nuestros resultados mostraron que *R. arenarum* superpone su dieta de forma intermedia con *H. cordobae*, mientras que *H. cordobae* presenta un solapamiento bajo en la dieta de *R. arenarum*, lo que sugiere que hay una partición de la calidad alimentaria. Otros autores han reportado una alta coincidencia en las dietas de larvas de anfibios. Sin embargo, Lajmanovich (1997) estableció que el espacio y el tiempo pueden ser mucho más importantes que la partición de recursos en la organización de las comunidades de renacuajos. En este sentido, ambas especies pueden coexistir ya que hay una partición temporal significativa entre sus períodos de larvas. Las larvas del género *Hypsiboas* que habitan en las montañas del centro de Argentina tiene un período larval muy largo, siendo posible encontrar formas larvarias durante la primavera, verano, otoño e incluso invierno (Palermo, 1985). Por su parte, *R. arenarum*, posee un período larval más limitado, entre la primavera y principios del verano (Cei, 1980). Estas características sugieren una partición temporal significativa. Sin embargo, de acuerdo a este punto de vista, sería esperable que *H. cordobae* presentara un mayor solapamiento en el ciclo larval de *R. arenarum* que viceversa.

En los renacuajos de ambas especies que coexisten en el sitio Piletas de decantación el contenido intestinal presentó un predominio de microalgas de ambientes antropizados, por la presencia de géneros como *Navicula*, *Nitzschia* y *Euglena* indicadores de las condiciones ambientales en diversos cuerpos de agua (Díaz Quirós y Rivera Rondón, 2004; Fabrizi, 2012; Bionda *et al.*, 2012), resistentes a la alta conductividad eléctrica y a la contaminación orgánica (Ramírez y Plata Díaz, 2008; Yucra y Tapia, 2008), y su presencia podría estar asociada a niveles altos de salinidad para este ambiente.

El análisis cualitativo del agua de las Piletas de decantación, reveló baja riqueza algal con respecto a los arroyos, esto puede deberse a la turbidez del agua, la profundidad, tipo de sustrato, variaciones de la conductividad en cortos períodos de tiempo o a altas

concentraciones de la salinidad ya que afecta el crecimiento del perifiton (Cañedo Arguello *et al.*, 2013).

Los taxones consumidos por los renacuajos de los arroyos ya sea los que circulan por roca granítica (A°G) como metamórfica (A°M) coinciden con los reportados por Arana *et al.*, (2003) en la dieta de *H. cordobae* característicos de ambientes poco modificados por la actividad humana. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a la composición de la comunidad algal en estos sitios, con géneros que se ven perjudicados a la presencia de altas concentraciones de flúor. Esto se observa en el análisis de ordenación de los diferentes rasgos de la dieta de *H. cordobae* en función de los sitios considerando la litología de los mismos (A°G y A°M). En esta investigación se encontró que los géneros pertenecientes a la división Cianobacteria son los más afectados con escasos representantes en la dieta de los renacuajos de los A°G. Esto se debe a su que son muy sensible a la toxicidad del fluoruro (Bhatnagar y Bhatnagar, 2000).

El efecto toxico del flúor sobre las algas reside principalmente en que este compuesto atraviesa la membrana de la célula, se aloja en el citoplasma e interactúa con la mayoría de los componentes celulares alterando en general el funcionamiento de la célula. Sin embargo, la concentración umbral a la que se manifiesta la toxicidad varía entre algas y cianobacterias y es fuertemente dependiente del pH (Bhatnagar y Bhatnagar 2000).

#### **5.4. Biomarcadores Genotóxicos**

Los anfibios en las primeras etapas de su desarrollo mostraron ser un modelo apropiado como organismos bioindicadores para explorar los efectos tóxicos de los mutágenos ambientales relevantes, tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Campana *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2004; Lajmanovich *et al.*, 2005; Cabagna 2006). Es importante notar que los glóbulos rojos en anfibios son nucleados; por lo tanto pasan por sucesivas divisiones celulares en la circulación (Duellman y Trueb, 1994) lo que los convierte en un material adecuado para los ensayos de genotoxicidad.

La evaluación de la calidad del medio ambiente, en particular los ecosistemas acuáticos, se ha basado tradicionalmente a través de mediciones físico-químicas del agua, pero en la actualidad se han complementado con otras técnicas que permiten predecir el

efecto de la exposición a la mezcla de xenobióticos en bajas concentraciones (Palma Acuña, 2005; Quesada García *et al.*, 2013).

La comunidad científica ha desarrollado diferentes ensayos de genotoxicidad capaces de detectar daño en el ADN provenientes de fuentes físicas, químicas o biológicas (Ribeiro *et al.*, 2017). Entre ellos encontramos al test de micronúcleos (Bly *et al.*, 2004) y anormalidades nucleares (da Silva Souza y Fontanetti, 2006; Marques *et al.*, 2009; Guilherme *et al.*, 2008) capaces de reflejar una medida de exposición temprana a un contaminante.

En las últimas décadas, los ensayos de genotoxicidad se han aplicado en estudios de biomonitoreo con diferentes especies, los cuales permiten estimar el riesgo para la salud humana (Ribeiro *et al.*, 2017). Asociados a estos ensayos los biomarcadores que utilizan a los eritrocitos de anuros son útiles para conocer la relación entre los organismos y su medio, y con ello la salud del ambiente (Hoffman *et al.*, 2003).

Actualmente existe una gran preocupación por los niveles crecientes de flúor en los ecosistemas acuáticos y su posible toxicidad para los organismos acuáticos, incluso para los seres humanos (Camargo 2003, Rosso *et al.*, 2011; Buchhamer *et al.*, 2012; Chai *et al.*, 2016). Esto se debe a que, altos niveles de flúor en humanos causan daños severos en varios tejidos como huesos, dientes, músculos esqueléticos, ligamentos, sistema gastrointestinal, eritrocitos (Goodarzi *et al.*, 2016) así como también alteraciones neurotóxicas (Xiong *et al.* 2007; Berger *et al.* 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior, al analizar el daño genético al que se encuentran expuestas las poblaciones de anfibios, se observa que el número de micronúcleos (MN) y anormalidades nucleares eritrocitarias (ANE) registrados en las especies estudiadas (*R. arenarum* e *H. cordobae*) es mayor en los sitios Arroyo Los Cerros Negros y las Piletas de decantación. Siendo, *H. cordobae* la especie que mayor frecuencia exhibió. Una mayor frecuencia de dichos biomarcadores podría estar reflejando efectos genotóxicos más marcados de estos ambientes sobre los eritrocitos. Esto podría ser explicado probablemente por la exposición crónica a las altas concentraciones de F<sup>-</sup> registradas en estos sitios. Ya que el flúor es un elemento esencial para todos los animales, pero en altas concentraciones produce toxicidad en muchos organismos acuáticos (Camargo, 2003). En el sitio Piletas de decantación, las frecuencias de MN y ANE registradas en los individuos, podrían verse

aumentadas por un efecto sinérgico, ya que además de valores altos de  $F^-$ , fueron registrados altas concentraciones de  $Cl^-$  y  $Na^+$ .

Las especies pueden diferenciarse en sus ciclos hematopoyéticos y el tiempo requerido para la maduración celular, la vida útil de sus eritrocitos y su capacidad para eliminar las células dañadas, lo que podría influir en la frecuencia de MN registrada en ambas especies (Udroi, 2006). Los eritrocitos micronucleados, reflejan daño genotóxico el cual puede haber ocurrido en un tiempo igual a la vida útil de los eritrocitos en circulación (Schlegel y MacGregor, 1982). Por lo tanto, la aplicación del test de micronúcleo en muestras de sangre periférica está indicada para condiciones de exposición crónica y estudios ecotoxicológicos *in situ*.

Varios autores han considerado el uso de las anomalías nucleares como indicadores de daño genotóxico (Ayyilon y García-Vázquez, 2000; Bombail *et al.*, 2001; Çavaş y Ergene Gözükar, 2003; da Silva Souza y Fontanetti, 2006; Prieto García *et al.*, 2007), con un origen similar al de micronúcleos (Serrano García y Montero Montoya, 2001). Sin embargo el mecanismo exacto de formación es desconocido.

da Silva Souza y Fontanetti (2006) y Lajmanovich *et al.*, (2014) señalan que las anomalías eritrocitarias están asociadas directamente con la inestabilidad genómica y representan una manera de eliminar cualquier material genético amplificado en la célula. En este sentido, la formación de los núcleos brotados está asociada a la amplificación de ADN o poliploidización, donde la anomalía tiende a eliminar el exceso de ADN con una formación posterior de micronúcleo (Fenech y Crott, 2002; Prieto García *et al.*, 2007). Lajmanovich *et al.*, (2014) sugirieron que la formación de anomalías nucleares eritrocitarias puede aumentar en situaciones de estrés, como alteraciones de la dieta, patologías o daños metabólicos.

En este estudio, se encontró un aumento de la toxicidad en las Piletas de decantación, donde el agua presenta la mayor concentración de iones, temperatura, pH más básico y el agua más dura. De acuerdo a Camargo (2003), la toxicidad del flúor es proporcional al aumento de la concentración del mismo, tiempo de exposición y a la temperatura del agua, mientras que disminuye su toxicidad a medida que el contenido de calcio y cloruro en el agua aumenta y cuando la dureza del agua es más blanda.

Desde el punto de vista ecotoxicológico, la exposición de la biota acuática a los mutágenos puede incrementar, entre otros efectos adversos, la frecuencia de mutaciones

recesivas, promoviendo así la disminución de las poblaciones de animales sensibles. La genotoxicidad detectada al monitorear mezclas complejas de los sistemas acuáticos no puede ser atribuida a un contaminante en particular y mayores estudios son requeridos para explorar la precisa composición de estas mezclas, pero los mecanismos de sinergia química para las mezclas no se entienden completamente. La frecuencia de MN demostró ser un índice fiable de rotura cromosómica y pérdida de cromosomas (Schmid, 1975); la evaluación de la frecuencia de MN *in situ* permite confirmar que esta técnica es recomendable para llevar a cabo como parte de los protocolos de monitoreo de los programas de evaluación toxicológica acuáticos.

Finalmente considerando la estrecha relación entre daño genético y carcinogénesis (Ribeiro 2012), es importante seguir compilando información acerca del efecto de las concentraciones reales de flúor en poblaciones de anfibios ya que permitiría medir el grado de riesgo al que están expuestos los anfibios y los riesgos potenciales para las poblaciones humanas.

### **5.5. Biomarcador Citotóxico**

Una de las funciones más importantes de los eritrocitos es de transportar oxígeno y dióxido de carbono. La presencia de eritroplástidos, es decir, formas anucleadas de glóbulos rojos en individuos de las Piletas de decantación puede representar un mecanismo especial para aumentar la eficiencia de transporte de oxígeno, en particular en condiciones de contaminación del agua o condiciones físicas no apropiadas para su disponibilidad, mejorando la relación de superficie/volumen de la célula (Barni *et al.*, 2007). Las frecuencias altas de aparición de eritrocitos anucleados en renacuajos de las Piletas de decantación en comparación con los adultos, se puede atribuir a la dependencia de esta etapa, al medio ambiente acuático, además, este sitio mostró menor concentración de oxígeno disuelto que los arroyos.

La presencia de células en división mitótica en condiciones de contaminación indica que la eritropoyesis es estimulada directamente en la circulación periférica en los adultos, lo que podría representar a corto plazo un mecanismo para aumentar la capacidad de transportar oxígeno en la sangre en las especies de anfibios (Barni, 2007).

La determinación de la frecuencia de eritrocitos inmaduros proporciona información importante acerca de la dinámica hematológica (Guilherme *et al.*, 2008). En este estudio, se observó un aumento de células inmaduras en los individuos capturados en las Piletas de decantación, quizás como respuesta al estrés (Valenzuela *et al.*, 2006) causado por las altas concentraciones de contaminantes (Prieto *et al.*, 2008) o relacionado con la disponibilidad de oxígeno. Aunque, el plano de división excéntrica o periférica de células globulares puede dar lugar a la formación de eritrocitos anucleados (Anbumani y Mohankumar, 2012), también se ha informado este tipo de células, en situaciones de cambio de dieta, enfermedades y estrés metabólico (Fijan, 2002). Algunas de estas condiciones podrían explicar su aparición en adultos.

La aparición de células inmaduras en altas frecuencias puede estar explicada por la presencia de parásitos ya que ha sido encontrada una relación entre número de parásitos y frecuencia de eritrocitos inmaduros. La acción de los parásitos se debe principalmente a la capacidad de estimular la regeneración celular (Martinez Silvestre y Arribas, 2012).

## **5.6. Hemoparasitos**

En este estudio se han registrado dos tipos de hemoparásitos: los intracelulares y los extracelulares. Dentro de los parásitos extracelulares el género *Trypanosoma* spp fue el que se registró en los extendidos sanguíneos y los hemogregarines dentro de los intracelulares. Ambos grupos han sido reportados como los dos hemoparásitos que infectan a los anuros (Leal *et al.*, 2009).

El término hemogregarine, se utiliza para describir parásitos de la sangre pertenecientes al suborden *Adeleorina*, Phylum *Apicomplexa* (Jakes *et al.*, 2003). Los principales géneros de este grupo son el *Hepatozoon* (Familia *Hepatozoidae*) y *Haemogregarina* (Familia *Haemogregarina*). La diferenciación entre estos géneros se hace generalmente a través de la observación de la etapa de esporangio del parásito en el vector (Leal *et al.*, 2009) aunque los estudios de caracterización y clasificación taxonómica son incompletos. Es importante mencionar que en los extendidos sanguíneos se han observado formas inmaduras y maduras de los gamontes, según la bibliografía estos estadios pueden ser tomados como especies diferentes (Smith, 1996).

El grupo *Haemogregarina* es un parasito intracelular cosmopolita de la sangre de los vertebrados terrestres. Estos protozoos son transmitidos a los vertebrados exclusivamente por ingestión de artrópodos hematófagos infectados no por las picaduras de artrópodos infectados (Smith, 1996; Ferguson *et al.*, 2013). Infectando tanto eritrocitos como leucocitos (Smith, 1996). En este estudio los únicos individuos parasitados fueron los de la especie *Hypsiboas cordobae* con intensidades que difieren según las poblaciones analizadas, mientras que las poblaciones de *Rhinella arenarum* no mostraron infecciones por hemoparásitos. Esta diferencia puede atribuirse a diferencias morfológicas así como también alimenticias entre las dos especies.

El principal vector descripto para las ranas en el medio acuático son las sanguijuelas (clase *Hirudinea*, Phylum Anelida) mientras que en el medio terrestre, la transmisión puede ocurrir a través de artrópodos hematófagos principalmente del género *Culex* y *Aedes* (Ferreira *et al.*, 2007; Sato, 2015) géneros de mosquitos más extendidas en el mundo.

Varias investigaciones señalan que las familias de anfibios que mayor prevalencia de tripanosomas registra es Leptodactylidae, seguida de Hylidae y Bufonidae (Ferreira *et al.*, 2007; Cabagna *et al.*, 2014). Resultados similares también se registraron en este estudio, con una mayor prevalencia en *Hypsiboas cordobae*, mientras que en *Rhinella arenarum* no se registraron hemoparásitos. La menor prevalencia e intensidad de parásitos registrado en *H. cordobae* del arroyo Las Hylas podría ser debido a una fuerte asociación de los parásitos con el medio ambiente alterado (Mackenzie, 1999). Esto no coincide con lo reportado por otros autores quienes aseguran que los anuros que habitan ambientes modificados, tienden a tener un número reducido de hemoparásitos (Mackenzie, 1999; Silva *et al.*, 2005), ya que los productos tóxicos tienden a romper la membrada de los tripanosomas y disminuir su número (Silva *et al.*, 2005). Quizás los altos valores registrados en las Piletas de decantación se deban principalmente a la mayor densidad de insectos que se observaron en este ambiente de tipo lentic; permitiendo una mayor transmisión del parasito ya sea por ingestión de insectos o por la picadura. Ambos mecanismos parecen ser importantes en la transmisión del parasito (Sato, 2015).

Los individuos con parasitemias menor o igual que 0,01 % de los eritrocitos no afecta la salud de los organismos, sin embargo, por encima de este valor las lesiones patológicas a nivel de hígado puede ser importantes (Sailasuta *et al.*, 2011). Muchas veces no manifiestan ningún signo clínico, cuando el porcentaje de eritrocitos infectados es alto, pero actúan como un factor de estrés permitiendo una mayor susceptibilidad a una infección secundaria (Sailasuta *et al.*, 2011).

Los eritrocitos parasitados presentaban algunas formas inmaduras del parasito entre 6-9 merozoitos lo que indica que la fisión binaria no es fija. Valores similares fueron registrados por Smith *et al.*, (2000) en otros ránidos.

## 5.7 Consideraciones Finales y Conclusiones

El término ecotoxicología fue definido por primera vez por Truhaut en 1969, como una extensión natural de la toxicología, que estudia los efectos ecológicos causados por los contaminantes naturales y sintéticos en los ecosistemas. En sus inicios, la ecotoxicología no ha incluido los campos de la toxicología para la salud industrial y humana o la toxicología de los cultivos domésticos y agrícolas, debido a que no se consideraban parte de los ecosistemas naturales. Históricamente, este término fue redefinido varias veces, pero la más aceptada fue recientemente, cuando Newman (1998), definió la ecotoxicología como la ciencia de los contaminantes y sus efectos sobre los constituyentes de la biosfera, incluido el hombre. La incorporación de los seres humanos en la definición, se debe a que muchos investigadores, creen que el hombre y sus artefactos culturales deben ser considerados como componentes de los sistemas naturales, no aparte de ellos.

En la actualidad la ecotoxicología representa una ciencia de gran interés por parte de las ciencias ambientales en general y particularmente la ecología práctica y aplicada, generando importante información sobre como las sustancias químicas pueden afectar a todos los seres vivos en relación directa con su medio ambiente. La ecotoxicología tradicional se centró durante décadas en evaluar los efectos individuales de los contaminantes sobre algunas especies considerados “organismos modelo”, centinelas o bioindicadores. En un principio, la mayoría de los estudios ecotoxicológicos fueron enmarcados en condiciones de laboratorio, los cuales proporcionaron información importante sobre el efecto de los contaminantes sobre las especies, pero no revelaban las condiciones reales (Crane *et al.*, 2007) y por lo tanto no aportaban una visión general en la calidad de un cuerpo de agua. Actualmente, dentro de la ecotoxicología los estudios se han focalizado en cómo los contaminantes afectan las interacciones ecológicas, y sus consecuencias sobre las poblaciones, comunidades, ecosistemas y la biósfera como un todo. Por este motivo, los ecotoxicólogos consideran que los estudios *in situ* ofrecen varias ventajas sobre las pruebas de laboratorio. En particular, reducen los problemas asociados con las manipulaciones de laboratorio, permiten evaluar los efectos de los contaminantes en condiciones ambientales naturalmente fluctuantes, de esta manera reducen la incertidumbre asociada con la extrapolación permitiendo detectar efectos sinérgicos.

Además, es necesario que un sistema sea evaluado incluyendo diversos biomarcadores, ya que un ambiente perturbado puede inducir cambios fenotípicos en un organismo que no necesariamente se correlacione con el verdadero estado de salud de la población (Polo-Cavia *et al.*, 2010).

El desarrollo del presente proyecto de tesis doctoral ha permitido estudiar *in situ*, el efecto de sistemas de redes hídricas ricos en flúor, cuyo aporte y transporte puede ser natural y/o artificial, sobre dos especies representativas de la provincia de Córdoba (*Rhinella arenarum* –sapo común- e *Hypsiboas cordobae* –ranita trepadora), evaluando un conjunto de respuestas biológicas (*endpoints*) de estrés ambiental. A partir del análisis de los resultados obtenidos, la estructura interna de los mismos y sobre la base de las discusiones realizadas en la sección anterior permiten deducir las siguientes conclusiones finales.

- La calidad del agua superficial de los sitios estudiados mediante el análisis físico-químico, permitió comprobar que los arroyos naturales que circulan por rocas metamórficas, Arroyo Las Hylas y Arroyo Los Vallecitos, presentan una baja peligrosidad para la biota acuática y consumo humano, debido a que la concentración de iones disueltos en agua se encuentran dentro de los valores permitidos de acuerdo a diferentes organismos nacionales e internacionales. Mientras que, el Arroyo Los Cerros Negros, el cual discurre todo su recorrido por roca granítica con presencia natural de flúor, hacen que estas aguas superficiales no sean aptas para el consumo humano y presenta peligrosidad para los organismos acuáticos por sus elevadas concentraciones de flúor. El sitio artificial, Piletas de decantación, presenta elevadas concentraciones de diferentes los iones mayoritarios ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{HCO}_3^-$ ), con fuertes variaciones en la conductividad en cortos periodos de tiempo, lo que resultaría en un ambiente no apto para el desarrollo de la biota acuática. Sin embargo, las especies de anfibios consideradas en este trabajo utilizan este ambiente exitosamente.

- Los biomarcadores morfológicos indicaron que los organismos de las Piletas de decantación tienen mayor condición corporal, ya que muestran mayor peso corporal. Por otro lado, se registró una mayor prevalencia de anomalías morfológicas en los adultos de *Rhinella arenarum* muestreados en el arroyo Los Cerros Negros. Esto estaría indicando que niveles de flúor por encima de los límites normales produce efectos teratogénicos sobre los anfibios anuros locales.

- Los biomarcadores genotóxicos indicaron alteraciones en el material genético en ambas especies, tanto en adultos como en larvas, capturadas en el sitio Piletas de decantación. Este resultado indicaría que este ambiente presenta sustancias que alteran el normal desarrollo de la división mitótica. La fase larval fue más vulnerable que la fase adulta, esto podría estar relacionado principalmente con el mayor tiempo de exposición a las sustancias, los que pueden ingresar por piel, boca y branquias. Por lo tanto, la exposición crónica a estos compuestos podría derivar en enfermedades degenerativas y neoplásicas en los órganos diana.

- Los biomarcadores citotóxicos revelaron que, de las dos especies analizadas, *Hypsiboas cordobae*, fue la más afectada en su dinámica hematológica, registrando los individuos del Arroyo Los Cerros Negros, elevadas frecuencias de eritrocitos inmaduros en circulación, lo que indicaría que la división celular también se está estimulando en circulación en presencia de las elevadas concentraciones de flúor y/o hemoparásitos.

- Los biomarcadores de comportamiento trófico permitieron distinguir la composición de la dieta de larvas en las Piletas de decantación del Arroyo Los Cerros Negros, encontrando taxones asociados a ambientes perturbados y otros taxones afectados directamente por las elevadas concentraciones de flúor. El sitio Las Piletas de decantación ofrece baja riqueza algal con respecto a los arroyos, lo que resulta en una menor condición corporal en las larvas en comparación a lo registrado en los arroyos. Esto confirma que el uso de la dieta en larvas es un indicador del estado de salud ambiental. Debido a que las larvas no muestran una alimentación especializada, sus dietas son indicadoras del tipo y abundancia de algas en su ambiente trófico.

- El análisis de los hemoparásitos reveló que la especie *Hypsiboas cordobae* fue la única afectada por la presencia de hemoparásitos tanto intracelulares como extracelulares, siendo los individuos de las Piletas de decantación, los que presentaron mayor intensidad y prevalencia de los mismos. Estos resultados concuerdan con varias investigaciones donde especifican que la familia Hylidae resulta ser la más afectada por sus características morfológicas y alimenticias.

El desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral posibilitó el estudio ecotoxicológico comparativo de dos especies representativas del área central de Argentina, *Hypsiboas cordobae* y *Rhinella arenarum* que habitan en las redes hídricas asociadas a la actividad minera, permitiendo sostener la hipótesis general: *las redes hídricas con altas concentraciones de flúor inducen cambios en los parámetros funcionales, morfológicos y genéticos representando un riesgo para las poblaciones de anfibios anuros que habitan esos ambientes*. Además, los individuos que habitan sistemas alterados pueden experimentar alteraciones reproductivas y conductuales que finalmente podrían conducir a una disminución de sus poblaciones naturales a largo plazo.

## 5.8 Recomendaciones

El estudio de los análisis de correspondencia canónica, en donde se entrecruzan las variables biológicas y químicas en función de los diferentes sitios de muestreo, permitiendo explorar de manera integrada la calidad del agua en cada sitio y el riesgo ecotoxicológicas de las dos especies consideradas, en donde las Piletas de decantación se diferencian de los tres sitios restantes, arroyos. Sobre la base de estos resultados es posible definir a Piletas de decantación como un sitio “*desfavorable*” para el desarrollo normal de los anfibios locales, mientras el sitio arroyo Los Cerros Negros, por sus características similares al anterior, puede también, por sus características, ser clasificado como desfavorable. Esta denominación coincide con ambas perturbaciones, artificial y natural, de elevadas concentraciones de flúor que registran ambos sitios, ya sea por el exceso de concentración de flúor producido por el proceso físico de flotación de la fluorita en la Piletas de decantación, como del proceso natural de erosión hídrica que produce el Arroyo

Los Cerros Negros al discurrir por el batolito de roca granítica de elevada concentración de este elemento.

Los resultados y conclusiones de este trabajo, manifiestan que los sistemas con elevadas concentraciones de flúor ya sea natural, como el Arroyo Los Cerros Negros y/o artificial, como las Piletas de decantación, por encima de los límites sugeridos para la protección de la biota acuática, impactan negativamente sobre las poblaciones de anfibios locales. Sin embargo, sería de suma importancia evaluar también el estado poblacional de estas especies analizando parámetros ecológicos tales como reclutamiento, edad, dieta de adultos, riqueza del ensamble de anfibios, entre otras, que permitirían obtener una visión más integral y holística del estado de conservación de los anfibios que habitan esta región con elevadas concentraciones de flúor, en donde se práctica la actividad minera desde hace mucho tiempo. Por otro lado, se observa que el sitio con alta concentración natural de flúor (Arroyo Los Cerros Negros) induce una serie de alteraciones en los organismos, que sumado a la presencia de depredadores (truchas) podrían aumentar el riesgo de declinación de las poblaciones locales de anfibios comparadas con otros arroyos, donde esta presión es mínima.

Es importante destacar que el sitio artificial, Piletas de decantación, es un ambiente elegido por los anfibios locales. Probablemente, esta elección se deba a la oferta de una serie de recursos y condiciones que les permiten perpetuar sus poblaciones. Algunos de estos recursos pueden representarse mediante los diferentes nichos explotados por los anfibios locales y pueden suponerse por las diferentes dimensiones del nicho tales como la vegetación, disponibilidad de alimento, refugio, microhábitats de reproducción, mayor temperatura del agua, etc.

Según estos resultados, el impacto del emprendimiento minero podría considerarse de bajo a moderado ya que se limita puntualmente a las Piletas de Decantación donde desaguan los desechos generados del proceso de flotación de la fluorita. Sin embargo, es importante mencionar que a nivel de paisaje también existe impacto generado por las voladuras y apertura de labores que el mismo también es puntual y se localiza a los alrededores del yacimiento sin impactar los arroyos circundantes.

Finalmente, se recomienda continuar el monitoreo del área de extracción minera, especialmente el arroyo que discurre al costado de las Piletas de decantación, porque los sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) representan uno de los parámetros físicos químicos a monitorear, debido a

que esta sal aumenta en los sistemas acuáticos de 30 a 40 veces por encima de los parámetros normales debido a la actividad minera, posiblemente por procesos de filtración desde las Piletas de decantación hacia los arroyos circundantes. Esta sal ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) podría representar un indicador directo de una actividad sustentable de extracción minera.

7 -REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, M.J., y Pearl, C.A. (2007). Problems and opportunities managing invasive bullfrogs. Is there any hope?. In: Biological invaders in inland waters: profiles, distribution and threats, F. Gherardi F., Ed, Springer, Dordrecht. p 679-693.
- Addy, K., Green, L. y Herron E. (2004). pH and Alkalinity. Kingston: University of Rhode Island.
- Alford, R. A. (1999). Ecology: resource use, competition, and predation. Tadpoles: the biology of anuran larvae, 240-278.
- Alho, J.S., G. Herczeg, F. Söderman, A. Laurila, K.I. Jönsson y J. Merilä. (2010). Increasing melanism along a latitudinal gradient in a widespread amphibian: local adaptation, ontogenic or environmental plasticity?. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 317.
- Altig, R., y G.F. Johnston. (1989). Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies and habitats. *Herpetol. Monogr.*, 3, 81-109.
- Anbumani, S., y M.N. Mohankumar. (2012). Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish *Catla catla*. *Aquat. Toxicol.* 122, 125-132.
- Andreazzini, J. (2002). Estudio de Impacto Ambiental en Minería, con énfasis en los Aspectos Geológicos Caso de estudio: mina de fluorita Cerros Negros. Sa. de Comechingones, Cba.”. Tesis de Lic. UNRC.
- Ankley, G. T., Degitz, S. J., Diamond, S. A., y J. E. Tietge. (2004). Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians. *Ecotoxicol Environ Saf*, 58(1), 7-16.
- Ankley, G.T., J.E. Tietge, G.W. Holcombe, D.L. DeFoe, S.A. Diamond, K.M. Jensen y S.J. Degitz. (2000). Effects of laboratory ultraviolet radiation and natural sunlight on survival and development of *Rana pipiens*. *Can J Zool* 78: 1092-1100.
- Ankley, G.T., S.A. Diamond, J.E. Tietge, G.W. Holcombe, K.M. Jensen, D.L. DeFoe y R. Peterson. (2002). Assessment of the risk of ultraviolet radiation to amphibians. I. Dose-dependent induction of hind limb malformations in the Northern Leopard frog (*Rana pipiens*). *Environ Sci Technol* 36: 2853-2858
- Antunes, S.C., B.B. Castro, B. Nunes, R. Pereira y F. Gonçalves. (2008). *In situ* bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicol Environ Saf* 71: 620-631
- APHA-AWWA. (2010). Standard Methods for the Examination of Water y Wastewater. 21 st Edition. Port City Press, Baltimore MD.
- Arana, M., Salas, N., Correa, A., y I. di Tada. (2003). Dieta de la larva de *Hyla pulchella cordobae* BARRIO, 1965 (Anura: Hylidae) en Pampa de Achala Córdoba Argentina. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp.*, 14, 1-2.
- Arkhipchuk, V. y N. Garanko. (2005). Using the nucleolar biomarker and the micronucleus on in vivo fish cells. *Ecotoxicol Environ Saf*: 62: 42-52.
- Arslan, Ö.Ç., H. Parlak, S. Katalay, M. Boyacioglu, M.A. Karaaslan y H. Guner. (2009). Detecting micronuclei frequency in some aquatic organisms for monitoring pollution of Izmir Bay (Western Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* DOI: 10.1007/s10661.
- Autrom, A. (2010). Susceptibilidad diferencial al níquel en distintos estadios del desarrollo embrionario larval de *Rhinella (Bufo) arenarum*. Tesis Doctoral UBA 154p.
- Aylon, F. y E. Garcia-Vazquez. (2000). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 467(2), 177-186.

- Babini, M.S., Bionda C.L., Salas N.E., y A.L. Martino. 2015. Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 118-125.
- Baffico, G.D., y C.A. Úbeda. (2006). Larval diet of the frog *Alsodes gargola* (Leptodactylidae: Telmatobiinae) and some ecological considerations on its role in alpine and mountain aquatic environments in Patagonia. *Amphibia-Reptilia*, 27(2), 161-168.
- Bagenal, T.B. y F.W. Tesch. (1978). Age and growth. In *Methods for the Assessment of Fish Production in Fresh Waters*, 3rd edn, 101–136. Bagenal, T.B. (ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Ballengée, B., y S.K. Sessions. 2009. Explanation for missing limbs in deformed amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 312:1-10.
- Baraquet, M. (2012). Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo pulchella (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina. Tesis Doctoral UNRC 206 p.
- Baraquet, M., Grenat, P.R., Salas, N.E. y A.L. Martino. (2014). Geographic variation in the advertisement call of *Hypsiboas cordobae* (Anura, Hylidae). *Acta Ethologica* 18(1), 79-86.
- Baraquet, M., Salas, N.E. y A.L. Martino. (2013). Advertisement calls and interspecific variation in *Hypsiboas cordobae* and *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) from central Argentina. *Acta Zool. Bulg.*, 65, 479-486.
- Barbier O., L. Arreola Mendoza y L.M. Del Razo. (2010). Molecular mechanisms of fluorite toxicity. *Chem-Biol Interact* 188: 319-333
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A. y V. Bertone. (2007). Evaluation of *Rana ssk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology* 81: 45–54.
- Barrio, I.G., San Sebastián, O., Bandrés, A., y X. R. Pilarte. (2009). Malformaciones en ejemplares de sapo corredor (*Epidalea calamita*) de la costa vasca. *Munibe Ciencias Naturales. Natur zientziak* (57), 163-167.
- Bechtel, H.B. (1995). *Reptile and amphibian variants: colors, patterns, and scales*. Portland: Krieger Publishing Company.
- Beebee, T.J.C. y R.A. Griffiths. (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, 125: 271-285.
- Bhatnagar, M., y A. Bhatnagar. (2000). Algal and cyanobacterial responses to fluoride. *Fluoride*, 33(2), 55-65.
- Bionda C., R. Lajmanovich, N. Salas, A. Martino y I. di Tada. (2011). Reproductive ecology of the common south american toad *Rhinella arenarum* (Anura: bufonidae): reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. *Journal of Herpetology*, 45: 261–264.
- Bionda, C., Luque, E., Gari, N., Salas, N.E., Lajmanovich, R.C., y A.L. Martino. (2013). Diet of tadpoles of *Physalaemus biligonigerus* (Leiuperidae) from agricultural ponds in the central region of Argentina. *Acta Herpetologica.*, 8:141-146.
- Bionda, C., N. Gari, E. Luque, N. Salas, R. Lajmanovich y A. Martino. (2012). Ecología trófica en larvas de *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en agroecosistemas y sus posibles implicaciones para la conservación. *Rev. Biol. Trop.*, 60: 771-779.
- Blanco, S., L. Ector y E. Becares. (2004). Epiphytic Diatoms as water quality indicators in Spanish shallow lakes. *Vie et Milieu* 54: 71-79.
- Blaustein A., B. Han, R. Relyea, P. Johnson, J. Buck, S. Gervasi y L. Kats. (2011). The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1223: 108–119.

- Blaustein, A. R., y P. T. Johnson. (2003). The complexity of deformed amphibians. *Front. Ecol. Environ.*, 1(2), 87-94.
- Bly, B.L., Knutson M., Sandheinrich M., Gray B., y D. Jobe. (2004). Flow cytometry used to assess genetic damage in frogs from farm ponds. *J. Iowa Acad Sc.*11:67-70.
- Bombail, V., D. Aw, E. Gordon y J. Batty. (2001). Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish [*Pholis gunnelus*] erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, 44(3), 283-392.
- Bonalumi, A., J. A. Sfragulla, D. Jerez, S. Bertolino, J. Sánchez Rial y E. Carrizo. (2014). Yacimientos de minerales y rocas industriales. En Geología y Recursos Naturales de la Provincia de Córdoba. Martino y Guerreschi (Ed.) *XIX Congreso Argentino Geológico*.
- Boone, M.D., R. D. Semlitsch, J.F. Fairchild y B.B. Rothermel (2004). Effects of an insecticide on amphibians in large - scale experimental ponds. *Ecological Applications*, 14(3), 685-691.
- Boyd, C. (1984). Water quality managent, for pand fish culture. El sebyer. Scientific publican company. Nederlan. 317p.
- Brodeur, J.C., G. Svartz, C. Perez Coll, D. Marino y J. Herkovits. (2008). Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology* 91:161–170.
- Brunetti, R., F. Majone, I. Gola y C. Beltrame. (1988). The micronucleus test: examples of application to marine ecology. *Marine ecology – progress series*. 44: 65-68.
- Buchanan, B.W., H. Savage, S. Wise y K. Bingel. 2008. Artificial night lighting affects anuran larval growth and development. Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH, HL, SSAR). Montreal, Quebec.
- Cabagna Zenklusen, M., R.C. Lajmanovich, A.M. Attademo, P.M. Peltzer, C. Junges, G. F. Bincucci y A. Basso. (2014). Generalidades sobre la hematología de anfibios anuros. Museo Provincial de Ciencias Naturales " Florentino Ameghino" 18: 1-16.
- Cabagna Zenklusen, M.C., R.C. Lajmanovich, P.M. Peltzer, A.M. Attademo, G.S. Fiorenza Bincucci y A. Bassó. (2009). Primeros registros de endoparásitos en cinco especies de anfibios anuros del litoral argentino. *Cuadernos de herpetología*, 23(1), 33-40.
- Cabagna, M., R. Lajmanovich, G. Stringhini, J.C. Sanchez Hernandez y P. Peltzer. (2005). Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology*. 2:373–380.
- Cabagna, M., R. Lajmanovich, P. Peltzer, A. Attademo y E. Ale. (2006). Induction of Micronucleus in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the Pyrethroid Insecticide Cypermethrin. *Environ Toxicol Chem*, 88: 729-737.
- Cabido, D., M. Cabido, S. M. Garré, J. A. Gorgas, R. Miatello, A. Ravelo, S. Rambaldi y J. L. Tassile. (2003). Regiones Naturales de la Provincia de Córdoba. Serie C. Publicaciones Técnicas. Agencia Córdoba. Dirección de Ambiente, 102 pp.
- Cabrera. (1994). Regiones fitogeográficas Argentinas. Enciclopedia de Agricultura y Jardinería. Tomo II, Fascículo I. Acme, Buenos Aires.
- Cairns, Jr. J., Heath, A.G., y B.C., Parker. (1975). The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia*, 47(1), 135-171.
- Cajaraville, M. P. (1998). Concepto de Biomarcador. Utilidad de los biomarcadores celulares en programas de seguimiento ambiental. Biología Celular en Toxicología Ambiental. Departamento de Zoología y Dinámica Celular Animal. UPV/EHU, Leioa. On line: [www.ehu.es/europeaclass2003/miren1.pdf](http://www.ehu.es/europeaclass2003/miren1.pdf)

- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J. Blasco, J. Porte, C. Sarasquete, C., y A. Viarengo. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *En: Science of the Total Environment. Special issue on towards an integrative approach in Environmental Contamination and Toxicology*. MP Cajaraville (guest ed.), Elsevier Science, Oxford, 247: 295-311.
- Camargo, J. A. (2003). Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere*, 50(3), 251-264.
- Camargo, J. A., y A. Alonso. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*, 16(2): 98 - 110.
- Campana, M., A. Panzeri, V. Moreno y F. Dulout. 2003. Micronuclei induction of *Rana catesbiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 99-103.
- Canadian Council of Ministers of Environment (CCME). (2002). Canadian water quality guidelines for protection of aquatic life: inorganic fluorides. 1-4.
- Cañedo Argüelles, M., B.J. Kefford, C. Piscart, N. Prat, R.B. Schäfer y C.J. Schulz (2013). Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. *Environ. Pollut.* 173, 157-167.
- Cao, J., J. Chena, J. Wanga, X. Wua, Y. Li y L. Xie (2013). Tissue distributions of fluoride and its toxicity in the gills of a freshwater teleost, *Cyprinus carpio*. *Aquat Toxicol* 130-131: 68-76
- Capitanelli, R.G. (1979). III. Clima, pp 45 – 138. En: Geografía Física de la provincia de Córdoba. Vázquez R.A., R.A. Miatello y M.E. Roqué (eds.). Ed. Boldt, Buenos Aires.
- Caraffa, E., C. Bionda, F. Pollo, N. Salas y A. Martino. (2013). Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. *Acta Toxicol. Argent.* 21: 78-84.
- Carballo, M. A. y M. D. Mudry. (2006). Indicadores y marcadores biológicos. En: Genética toxicológica. Mudry M.D., Carballo M.A. (Eds). De los cuatro vientos, Buenos Aires, Argentina, p 83-108.
- Carey C. y C.J. Bryant. (1995). Possible interrelations among environmental toxicants, Amphibian development, and decline of Amphibian populations. *Environmental Health Perspectives* 103: 13-17.
- Carrasco, K.R., K.L. Tilbury y M.S. Mayers. (1990). Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 2123–2136.
- Castillo Morales, G. (Ed) (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA (México)-IDRE (Canadá).
- Castro, B.B., L. Guilhermino y R. Ribeiro. (2003). In situ bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*. *Environ Pollut* 125(3): 325-335
- Çavaş, T. y S. Ergene-Gözükara. (2003). Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 538: 81-91.
- Cei, J.M. (1980). Amphibians of Argentina, *Monit. Zool. Ital. Monogr.* 2, Nuova Serie, Firenze, pp 609.
- Chai, L., H. Wang, H. Zhao y S. Dong. (2017). Chronic Effects of Fluoride Exposure on Growth, Metamorphosis, and Skeleton Development in *Bufo gargarizans* Larvae. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 98(4), 496-501.

- Chai, L., L. Xiaoli, J. Ling, D. Suiming y W. Hongyuan. (2011). Acute toxicity and DNA damage of fluoride to larval big toad *Bufo gargarizans*. In *Water Resource and Environmental Protection (ISWREP), International Symposium* 430-433
- Chai, L., S. Dong, H. Zhao, H. Deng, y H. Wang. (2016). Effects of fluoride on development and growth of *Rana chensinensis* embryos and larvae. *Ecotoxicol Environ. Saf.* 126: 129-137.
- Chambers, D.L. (2011). Increased conductivity affects corticosterone levels and prey consumption in larval amphibians. *Journal of Herpetology* 45 (2), 219-223.
- Christy, M.T. y C.R. Dickman. (2002). Effects of salinity on tadpoles of the green and golden bell frog (*Litoria aurea*). *Amphibia-Reptilia*, 23(1): 1-11.
- Collins, S. J., y R. W. Russell. (2009). Toxicity of road salt to Nova Scotia amphibians. *Environmental Pollution*, 157(1), 320-324.
- Colwell, R.K. (1997). EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9.1.0. User's Guide and application published. On line: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>
- Coniglio, J. (2006). Evolución petrológica y metalogenética del batolito Cerro Áspero en relación con el ciclo geoquímica endógeno del Flúor, Sierras de Comechingones, Córdoba, Argentina. Tesis doctoral UNRC. 163 p.
- Corigliano, M. 2008. Índices para evaluar la calidad ambiental en ríos serranos urbanos mediante indicadores. *Rev. UNRC* 28(1-2): 33-54.
- Correa, J., M. Ramírez, J. De La Harpe, D. Román y L. Rivera. (2000). Copper, copper mining effluents and grazing as potential determinants of algal abundance and diversity in northern Chile. *Environmental Monitoring and Assessment* 61: 265-281.
- da Silva Souza, T. y C. Fontanetti. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alteration in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research* 605: 87-93.
- Dacie, S.J. y S.M. Lewis. (1995). *Practical Haematology*, eight ed. Churchill, Livingstone, Edinburgh.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo y C.W. (2012). InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- di Tada, I. (1999). Patrones de distribución de los anfibios anuros de la provincial de Córdoba. Tesis Doctoral UNC p 155.
- Díaz Quirós, C. y C.A. Rivera Rondón. (2004). Diatomeas de pequeños ríos andinos y su utilización como indicadores de condiciones ambientales. *Caldasia*, 26: 381-394.
- Djomo, J.E., V. Ferrier y C. Békaert. (2000). Amphibian micronucleus test in vivo [Jaylet Test] to evaluate the genotoxicity of petrochemical waste waters. *Bull Environ Contam Toxicol.* 65:168-174.
- Duellman, W. E. y L. Trueb. (1994). *Biology of amphibians*. John Hopkins University Press, Baltimore, Md.
- Duellman, W.E. y L. Trueb (1986). *Biology of amphibians* Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press
- Duellman, W.E., y L. Trueb. (1986). *Biology of amphibians*. Mc Graw Hill Inc., USA.
- Echeverría, D.D., Volpedo, A.V., y V.I Mascitti. (2007). Diet of tadpoles from a pond in Iguazú National Park, Argentina. *Gayana.*, 71, 8-14.

- El Khalil, H., El Hamiani, O., Bitton, G., Ouazzani, N. y A. Boularbah. (2008). Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: Monitoring metal content and toxicity of soil runoff and groundwater. *Environ Monit Assess*, 136: 147–160.
- Environmental Protection Agency, (1988). Ambient Water Quality Criteria for Chloride, Office of Water, Regulations, and Standards, Criteria and Standards Division, Washington, DC. EPA Pub. No. 440588001.
- Ergene, S., T. Çavas, A. Çelik, N. Köleli, F. Kaya y A. Karahan. (2007). Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16: 385–391.
- Esteves, Francisco de Assis. (2011). 2nda ed. Fundamentos de Limnología. Interciencia, Brasil.
- Fabrizi, L. (2012). Eutrophication of water bodies introduction. Lenntech. Water treatment solutions. <http://www.lenntech.com/espanol/Eutroficacion-de-las-aguas/introduccion.htm>. Accessed 12 August 2014.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81–95.
- Fenech, M., y J.W. Crott. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 504, 131-136.
- Ferguson, L. V., Hillier, N. K., y Smith, T. G. (2013). Influence of Hepatozoon parasites on host-seeking and host-choice behaviour of the mosquitoes *Culex territans* and *Culex pipiens*. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 2: 69-76.
- Ferreira, R. C., Campaner, M., Viola, L. B., Takata, C. S. A., Takeda, G. F., y M.M.G Teixeira. (2007). Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology*, 134(11), 1623-1638.
- Fijan, N., (2002). Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *J. fish. Biol.* 60(4), 999-1014.
- Foguelman, D. y A. E. Brailovsky. (1999). Buenos Aires y sus Ríos. El agua en el Área Metropolitana. Lugar Editorial. Buenos Aires, Argentina.
- Freda, J., y W. A. Dunson. (1984). Sodium balance of amphibian larvae exposed to low environmental pH. *Physiological Zoology* 57: 435-443.
- Frost, D.R. (2014). Amphibian species of the world. New York: American Museum of Natural History. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>.
- Gallardo, J.M. (1987). Anfibios Argentinos, guía para su identificación. Biblioteca Mosaico. pp 98.
- García, G., y F. Fontúrbel. (2003). Propuestas para un desarrollo sostenible. Lago Titikaka por estrategias K. Ed. Publicaciones Integrales. La Paz.
- Gatica, E., C. Almeida, M. Mallea, M. Corigliano y P. González. (2011). Water quality assessment, by statistical analysis, on rural and urban areas of Chocancharava River (Río Cuarto), Córdoba, Argentina. *Environ Monit Assess* DOI: 10.1007/s10661-011-2495-7
- Gauthier, L., E. Tardy, F. Moucher y J. Marty. (2004). Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Sc. Total Environm.* 323: 47-61.
- Giuliano Albo M.J. y M.T. Blarasin. (2013). Hidrogeoquímica y estimación del fondo natural de nitratos del agua subterránea en un agroecosistema del pedemonte de la sierra de Comechingones Córdoba (Argentina). *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 71(3).

- Goh, E.H. y A.W. Neff (2003). Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. *Food Chem. Toxicol.* 41(11): 1501-1508.
- Gökalp Muranlı, F. D., y U. Güner. (2011). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 726(2), 104-108.
- Gómez, N., J.C. Donato, A. Giorgi, H. Guasch, P. Mateo y S. Sabater. (2009). La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos. En: Elosegí, A. y S. Sabater. *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Fundación BBVA. Pp. 219-242.
- Gonzalo, C., y J.A. Camargo. (2012). Fluoride bioaccumulation in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) as suitable bioindicator of fluoride pollution in freshwater ecosystems. *Ecological Indicators*, 20, 244-251.
- Gosner, K. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183-190.
- Gray M.J. y L.M. Smith. (2005). Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians. *Journal of Wildlife Management*, 69: 515-524.
- Gualdoni, C. M., Oberto, A. M., y Raffaini, G. B. 1994. La aplicación de índices bióticos en la subcuenca del río Chocancharava (Cuarto) (Córdoba, Argentina). *Rev. UNRC*, 14(1): 39– 52.
- Guilherme, S., M. Válega, M.E. Pereira, M.A. Santos, y M. Pacheco. (2008). Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3), 411-421.
- Guilherme, S., Válega, M., Pereira, M. E., Santos, M. A., & Pacheco, M. (2008). Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotoxicology and environmental safety*, 70(3), 411-421.
- Guiry, M.D., y G.M. Guiry. (2014). Algae Base. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. Accessed 20 March 2014.
- Herkovits, J., C. Perez-Coll y F. Herkovits. (1996). Ecotoxicity in the Reconquista River, Province of Buenos Aires, Argentina: A Preliminary Study. *Environ. Health Perspect.* 104: 186-189.
- Heyer, W., M. Donnelly, R. Mcdiarmid, L. Hayek y M. Foster. (1994). Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians. (eds.). Washington, Smithsonian Institution Press, pp 364.
- Heyer, W.R. (1974). Niche measurements of frog larvae from a seasonal tropical location in Thailand. *Ecology Tempe* 55: 651-656.
- Hill, B.H., A.T. Herlihy, P.R. Kaufmann, R.J. Stevenson, F.H. McCormick y C.B. Johnson. (2000). Use of periphyton assemblage data as an index of biotic integrity. *J N Am Benthol Soc*, 19(1): 50-67.
- Hoffman, D.J., B.A. Rattner, G.A. Burton JR. y J. Cairns JR. (2003). Handbook of Ecotoxicology, 2nd ed. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, pp 1290.
- Hopkins, W.A. 2007. Amphibians as Models for Studying Environmental Change. *ILAR Journal* 48 (3): 270-277.
- Hurtado Alarcon, J., D. Solarte, A. Victor, J.B. Lopez Ortiz y F.L. Montoya Herrera. (2007). Prueba de micronúcleos en eritrocitos de sabaletas (*Brycon henni* E.) presentes en el Río Porce y en el ensamble Porce II, Antioquia *Rev. Elec. Ing. Produc. Ac.* p 238-245.
- IUCN. (2014). Conservation International, and NatureServe. An analysis of amphibians on the 2008 IUCN red list. <http://www.iucnredlist.org/amphibians>.
- Jakes, K., P.J. O'donoghue y S.L. Cameron. (2003). Phylogenetic relationships of Hepatozoon (Haemogregarina) boigae, Hepatozoon sp., Haemogregarina clelandi and Haemoproteus

- chelodina from Australian reptiles to other Apicomplexa based on cladistic analyses of ultrastructural and life-cycle characters. *Parasitology*, 126(06), 555-559.
- Jakob, E.M., S.D. Marshall y G.W. Uetz. (1996). Estimating fitness: a comparison of body condition indices. *Oikos* 77: 61-67.
- Jawor, J.M., Breitwisch, R (2003). Melanin ornaments, honesty, and sexual selection. *Auk* 2003, 120:249-265
- Johnson P.T.J., K.B. Lunde, E.M. Thurman, E.G. Ritchie, S.N. Wray, D.R. Sutherland, J.M. Kapfer, T.J. Frest, J. Bowerman, y A.R. Blaustein. (2002). Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs* 72:151–168.
- Johnson, P.T.J., E.R. Preu, D.R. Sutherland, J. Romansic, B. Han y A.R. Blaustein. (2006). Adding infection to injury: synergistic effects of predation and parasitism on salamander limb malformations. *Ecology* 87: 2227-2235
- Johnson, P.T.J., y J. Bowerman. (2010). Do predators cause frog deformities? The need for an ecoepidemiological approach. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 314:515-518.
- Joy, C.M., y K.P. Balakrishnan. (1990). Effect of fluoride on axenic cultures of diatoms. *Water Air Soil Pollut.* 49, 241–249.
- Junín, M.; N. Rodríguez Mendoza; M. Heras y L. Braga. (2008). Valoración preliminar de la autorización de bioindicadores de contaminación en alguna especies de peces del delta del río Paraná, Argentina. *Las Ciencias Revista de la Universidad Maimónides*.
- Jüttner, I., H. Rothfritz y S.J. Ormerod. (1996). Diatoms as indicators of river quality in the Nepalese Middle Hills with consideration of the effects of habitat-specific sampling. *Freshwater Biology*, 36: 475-486.
- Karraker, N.E. (2007). Are embryonic and larval green frogs (*Rana clamitans*) insensitive to road deicing salt? *Herpetol. Conserv. Biol.* 2, 35–41.
- Kaushal, S.S., Groffman, P.M., Likens, G.E., Belt, K.L., Stack, W.P., Kelly, V.R., Band, L.E., y G.T. Fisher. (2005). Increased salinization of fresh water in the northeastern United States. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 13517–13520.
- Kelly, M. (2013). Of Microscopes and Monsters. Journeys through the hidden world of Britain's freshwaters. [www.martynkelly.co.uk](http://www.martynkelly.co.uk).
- Kelm, U., S. Helle, R. Matthies y A. Morales. (2009). Distribution of trace elements in soils surrounding the El Teniente porphyry copper deposit, Chile: the influence of smelter emissions and a tailings deposit. *Environ Geol* 57: 365-376.
- Klobučar Göran, I. V., A. Štambuk, M. Pavlica, M. Sertié Piré, B. Kutuzovic Hackenberger y K. Hylland. (2010). Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology* 19: 77-84.
- Klug, W.S. y M.R. Cummings. (1999). Conceptos de Genética. Madrid: Prentice-Hall.
- Komárek, J., y T. Hauer. (2013). CyanoDR.cz - On-line database of cyanobacterial genera. World-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia y Inst. of Botany AS CR. <http://www.cyanodR.cz>. Accessed 16 March 2014.
- Korzh, A.P., y V.Y. Zadorozhnyaya. (2013). The Biological Characteristic of Representatives of the Genus Hepatozoon (Apicomplexa, Adeleorina) in the Marsh Frog (*Pelophylax ridibundus*) Separate Populations of Zaporozhzhya Region. *Vestnik Zoologii*, 47(2), 34.
- Kraus, F. (2009): Alien reptiles and amphibian. A scientific compendium and analysis. Invading nature: Springer series in invasion ecology 4 USA.

- Lajmanovich, R. y P. Peltzer. (2008). Plan de monitoreo ambiental para el estudio del impacto de cultivos extensivos de arroz sobre el macrosistema Iberá.
- Lajmanovich, R., M. Izaguirre y V. Casco. (1998). Paraquat tolerance and Alteration of internal gills structures of *Scinax nasica* tadpoles (Anura:Hylidae), en: *Arch. Environ. Contam Toxicol.* 34: 364-369.
- Lajmanovich, R., P. de La Sierra, F. Marino, P. Peltzer, A. Lenardón y E. Lorenzatti. 2005. Determinación de residuos de organoclorados en vertebrados silvestres del Litoral Fluvial de Argentina. *INSUGEO, Miscelánea*, 14: 255-262.
- Lajmanovich, R., Peltzer P., Junges C.M., Attademo A., Sanchez L.C., y A. Bassó. (2010). Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River flood plain: Implication for ecological risk assessment of soybean crops. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.73:1517-1524.
- Lajmanovich, R.C. (1997) Alimentación de larvas de anuros en ambientes asociados al sistema del Paraná. *Doñana Acta Vertebrata* 24(1-2): 191-202
- Lajmanovich, R.C., Cabagna Zenklusen, M.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Bassó, A., y E. Lorenzatti. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Toxicol. Environ. Mutagen.* 769, 7-12.
- Lajmanovich, R.C., y V.C. Fernández. (1995). Alimentación de larvas de *Bufo arenarum* Hensel, 1867 (Amphibia, Bufonidae) en ambientes del Río Paraná. *Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Chile.*, 45, 7-18.
- Lambert, M. R. K. (1997). Reptiles and amphibians as bioindicators to assess the environmental effects of heavy spillage from a destroyed pesticide store near Hargeisa (Somaliland). Böhme, W., Bischoff, W. y T. Ziegler (eds.). *Herpetologia Bonnensis* 0: 215-220.
- Landis, W. G. y M. H. Yu. (1998). *Environmental Toxicology* Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Langan E.M. (2003). Sublethal effects of sodium nitrate on developmental rate and body length in southern toad (*Bufo terrestris*) tadpoles. Thesis Master of Science. University of Florida.
- Lannoo, M. (2008). Malformed frogs. The Regents of the University of California. 270 p.
- Lascano, C., V. Sotomayor, A. Ferrari y A. Venturino. (2009). Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta Toxicol. Argent.* 17: 8-19.
- Lavoie, I., M. Lavoie y C. Fortin. (2012). A mine of information: benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings. *Sci Total Environ* 425: 231-241
- Law 24051. (1992). Ley Nacional de Residuos Peligrosos (Regime for hazardous wastes). Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Argentina. On line <http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/residuos/ley24051.htm>. Access 20 may 2015.
- Leal, D. D., L. H. O'dwyer, V. C. Ribeiro, R. J. Silva, V. L. Ferreira, y R. B. Rodrigues, (2009). Hemoparasites of the genus Trypanosoma (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States-Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(2), 199-206.
- LeBlanc, G.A. (1984). Interspecies relationships in acute toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 3, 47-60.
- Lescano J. (2014). Las truchas acorralan a dos anfibios autóctonos. Acceso 10 de mayo de 2016. <http://www.lavoz.com.ar/ambiente/las-truchas-acorralan-dos-anfibios-autoctonos>

- Little, E. E., Bridges, C.M., Linder, G., Boone, M. (2003). Establishing Causality in the Decline and Deformity of Amphibians: The Amphibian Research and Monitoring Initiative Model. In: Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations, ASTMSTP 1443, G. Linder, S. Krest, D. Sparling, and E. Little, Eds., ASTM International, West Conshohocken, PA
- Livingstone, D. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57: 195-211.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M. 2004. 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN).
- Lucero, L., S. Pastor, S. Suárez, R. Durbán, C. Gómez y T. Parrón. (2000). Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research* 464: 255-262.
- Lüddecke, H. 2002. Variation and trade-off in reproductive output of the Andean frog *Hyla labialis*. *Oecologia* 130: 403-410.
- Machado da Rocha, C. (2011). The Micronucleus Test in Erythrocytes of Amphibian Larvae as Tool for Xenobiotic Exposure Risk Assessment: A Brief Review and an Example Using *Lithobates catesbeianus* Exposed to Copper Sulphate. *Middle-East Journal of Scientific Research* 8 (1): 23-29.
- Mackenzie, K. (1999). Parasites as pollution indicators in marine ecosystems: a proposed early warning system. *Mar. Poll. Bull.* 38 (11): 955-959.
- Magurran, A. (1987). Ecological diversity and its measurements. Vedral, Princeton, Nueva Jersey, EEUU.
- Maluszynska, J. y J. Juchimiuk. (2005). Plant genotoxicity: A molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Journal of Plant Genotoxicity* 56: 177-184
- Manzanilla, J., y J. Péfaur. (2000). Consideraciones sobre métodos y técnicas de campo para el estudio de anfibios y reptiles. *Rev. Ecol. Lat. Am.* 7: 17- 30.
- Margalef, R. (1983). Limnología. Capt.1. Omega. S.A Barcelona.
- Marques, S. M., Antunes, S. C., Pissarra, H., Pereira, M. L., Gonçalves, F., & Pereira, R. (2009). Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 187-195.
- Martinez Haro, M., Beiras, R., Bellas, J., Capela, R., Coelho, J. P., Lopes, M., Moreira Santos, A.M., Reis Henriques, R., Ribeiro, M., Santos, M., y J.C. Marques. (2015). A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? *Ecological Indicators*, 48, 8-16.
- Martinez Valenzuela, C. y S. Gómez Arroyo. (2007). Riesgo genotóxico por la exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 23: 185-200
- Martinez-Silvestre, A. y O. Arribas. (2012). Blood differential count and effect of haemoparasites in wild populations of Pyrenean lizard *Iberolacerta aurelioi* (Arribas, 1994). *Basis and Applied Herpetology* 28: 79-86
- Martinuzzi, C.S., P.M. Peltzer, A.M. Attademo, C.M. Junges y R.C. Lajmanovich. (2016). Albinism in larvae of the Chaco an frog *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) from an urban lake from Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 30(2).
- McCarthy, J. F., y Shugart, L. R. (1990). Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers.

- McDiarmid, R.W., y R. Altig. (1999). Tadpoles: the biology of anuran larvae. University of Chicago Press.
- Meteyer, C.U. (2000). Field Guide to Malformations of Frogs and Toads. USGS National Wildlife Health Center. Madison.
- Milu, V., J. Leroy y C. Peiffert. (2002). Water contamination downstream from a copper mine in the Apuseni Mountains, Romania. *Environmental Geology* 42:773–782.
- Moriarty, F. (1984). Ecotoxicología. El estudio de contaminantes en ecosistemas. Editorial: Academia, León, 1985.
- Moriarty, F. (1999). Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems, 3 ed. Academic Press, London, pp 347.
- Mudry, M.D. y X.C. Abrevaya. (2006). Evaluación de aneugenicidad y clastogenicidad. En: Genética toxicológica. Mudry MD, Carballo MA (Eds). De los cuatro vientos, Buenos Aires, Argentina, p 227-298.
- Newman, M.C. (1998). Fundamentals of Ecotoxicology, Sleeping Bear/Ann Arbor Press, Chelsea, Michigan.
- Nichol, B.E., K. Budd, G.R. Palmer y J.D. MacArthur. (1987). The mechanisms of fluoride toxicity and fluoride resistance in *Synechococcus leopoliensis* (cyanophyceae). *J. Phycol.* 23, 535–541.
- Nöller, H. G. (1959). Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 269: 98-100.
- Oggero, A., y M. Arana. (2012). Inventario de las plantas vasculares del sur de la zona serrana de Córdoba, Argentina. *Hoehnea*, 39 (2): 171-199.
- Ongley E.D. (1997). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. Cuadernos de Riego y Drenaje N 55. FAO. Roma. On line: <http://www.fao.org/docrep/W2598S/W2598S00.htm>
- Ossana, N. (2011). Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Ouellet, M., Bonin, J., Rodrigue, J., DesGranges, J. L., y S. Lair. (1997). Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of wildlife diseases*, 33 (1), 95-104.
- Owor, M., T. Hartwig, A. Muwanga, D. Zachmann y W. Pohl. (2007). Impact of tailings from the Kilembe copper mining district on Lake George, Uganda. *Environ Geol* 51: 1065–1075.
- Palermo, M.A. 1985. Anfibios y Reptiles fauna Argentina. Centro editor de América Latina S.A.
- Palma Acuña, P.S. (2005). Ensayo de micronúcleo en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para la evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el río Traiguén. Tesis presentada para optar al grado de Licenciado en Recursos Naturales. Universidad Católica de Temuco, Facultad de Ciencias, Chile 130p.
- Passy, S.I. (2007). Diatom ecological guilds display distinct and predictable behaviour along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany* 86: 171-178.
- Passy, S.I. y C.A. Larson. (2011). Succession in Stream Biofilms is an Environmentally Driven Gradient of Stress Tolerance. *Microb. Ecol.* 62: 414-424.
- Pavignano, I. (1990). Niche overlap in tadpole populations of *Pelobates fuscus insubricus* and *Hyla arborea* at a pond in north western Italy. *Italian Journal of Zoology*, 57(1), 83-87.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Repetti, M. R. y H. Beldoménico. (2013). Effect of exposure to contaminated pond

- sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 142-151.
- Peltzer, P., R. Lajmanovich, L. Sanchez, A. Attademo, C. Junges, C. Bionda, A. Martino y A. Bassó. (2011). Morphological abnormalities in amphibian populations from the mideastern region of Argentina. *Herpetological Conservation and Biology*, 6: 432-442.
- Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Lajmanovich, R.C., Junges, C.M., Beltzer, A.H., y L.C. Sanchez. (2010). Trophic dynamics of three sympatric anuran species in a soybean agroecosystem from Santa Fé Province, Argentina. *Herpetological J.* 20, 261-269.
- Perry, G., B.W. Buchanan, R. Fisher, M. Salmon y S. Wise. 2008. Effects of artificial night lighting on reptiles and amphibians in urban environments. In: Chapter 16 - Ecology, Conservation and Management of Amphibians and Reptiles in Urban and Suburban Environments. J. C. Mitchell, R. E. Jung Brown and B. Bartholomew (ed.). *Herpetological Conservation* 3: 211-228.
- Phalphares, D. y C. Koppe Grisolia. (2002). Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology*, 25: 281-284.
- Pianka, E.R. (1973). The structure of lizard communities. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 4, 53-74.
- Piha, H., M. Pekkonen, y J. Merila. (2006). Morphological abnormalities in amphibians in agricultural habitats: A case study of the Common Frog *Rana temporaria*. *Copeia* 2006: 810-817.
- Pollo, F., Bionda, C., Salinas, Z., Salas, N., y A. Martino. (2015). Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental monitoring and assessment*, 187(9), 1-9.
- Pollo, F., N. Salas, M. Mancini y A. Martino. (2012). Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas. *Acta Toxicol. Argent* 20:64-70.
- Polo Cavia, N., Engstrom, T., López, P., y J. Martín. (2010). Body condition does not predict immunocompetence of western pond turtles in altered versus natural habitats. *Animal Conservation*, 13(3), 256-264.
- Polo Cavia, N., y I. Gómez Mestre. (2017). Pigmentation plasticity enhances crypsis in larval newts: associated metabolic cost and background choice behaviour. *Scientific reports*, 7.
- Pough, F.H., y R.E. Wilson. (1977). Acid precipitation and reproductive success of *Ambystoma* salamanders. *Water, Air, and Soil Pollution* 7.3: 307-316.
- Prieto García, F., O.A. Baez Ramirez, W. Scout, J.C. Gaytán Oyarzún, A. Zúñiga Estrada. (2007). Toxicidad y teratogénesis por arsénico en el pez cebra [*Danio rerio*]. *Revista de Toxicología*, 24(1), 18-22.
- Prieto, Z., Incio, J. L., Quijano Jara, C., Fernández, R., Polo Benites, E., Vallejo Rodríguez, R., y L. Villegas Sánchez. (2008). Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (Tilapia). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 25(1): 51-58
- Quesada Garcia, A., Valdehita, A., Torrent, F., Villarroel, M., Hernando, M.D., y J.M. Navas. (2013). Use of fish farms to assess river contamination: Combining biomarker responses, active biomonitoring, and chemical analysis. *Aquatic Toxicology*, 140, 439-448.
- Ramírez, A. (2006). Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. *Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Pp 49-58

- Ramírez, C.A.M., y Y. Plata Díaz. (2008). Diatomeas perifíticas en diferentes tramos de dos sistemas lóticos de alta montaña (páramo de Santurban, norte de Santander, Colombia) y su relación con las variables ambientales. *Acta Biol. Colomb.*, 13, 199-216.
- Reading, C.J., y R.T. Clarke. (1995). The effects of density, rainfall and environmental temperature on body condition and fecundity in the common toad, *Bufo bufo*. *Oecologia*, 102(4), 453-459.
- Ribeiro, D.A. (2012). Cytogenetic biomonitoring in oral mucosa cells following dental X-ray. *Dentomaxillofacial Radiology*, 41(3): 181-184.
- Ribeiro, D.A., Yujra, V.Q., da Silva, V.H. P., Claudio, S.R., Estadella, D., de Barros Viana, M., y Oshima, C.T.F. (2017). Putative mechanisms of genotoxicity induced by fluoride: a comprehensive review. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-6.
- Rimet, F. y A. Bouchez. (2011). Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: Lotic mesocosm approaches. *Ecological Indicators*, 11: 489-499
- Rossa Feres, D.C., Jim, J., y M. Gonçalves Fonseca. (2004). Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). *Rev. Bras. Zool.*, 21, 745-754.
- Rosso, J. J., Puntoriero, M. L., Troncoso, J. J., Volpedo, A. V., y Cirelli, A. F. (2011). Occurrence of fluoride in arsenic-rich surface waters: a case study in the Pampa Plain, Argentina. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 87(4), 409.
- Rosso, J., M. Puntoriero, J. Troncoso, A. Volpedo y A. Fernández Cirelli (2011). Occurrence of Fluoride in Arsenic-Rich Surface Waters: A Case Study in the Pampa Plain, Argentina. *Bull. Environ Contam Toxicol* 87: 409-413
- Ruiz, A., J. Maerz, A. Davis, M. Keel, A. Ferreira, M. Conroy, L. Morris y A. Fisk. (2010). Patterns of Development and Abnormalities among Tadpoles in a Constructed Wetland Receiving Treated Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 44: 4862-4868.
- Sailasuta, A., Satetasit, J., y M. Chutmongkonkul. (2011). Pathological Study of Blood Parasites in Rice Field Frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). *Veterinary medicine international*, 1-5. doi:10.4061/2011/850568.
- Sánchez-Vélez, A. y R. M. García-Núñez. (1999). Biomonitorio de Ríos en la Gestión de Cuencas; una aproximación introductoria. IX Congreso Nacional de Irrigación, simposio 4 manejo integral de cuencas hidrológicas. México. 71 p.
- Sanzo, D. y S. J. Hecnar. (2006). Effects of road de-icing salt (NaCl) on larval wood frogs (*Rana sylvatica*). *Environ. Pollut.* 140(2), 247-256.
- Sato, L. H. (2015). Diversidade, biologia, filogeografia e taxonomia molecular de tripanossomas de anuros da família Leptodactylidae. Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo.
- Schlegel R. y J.T. MacGregor (1982). The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. *Mutat. Res.* 104: 367-369
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31: 9-15.
- Serrano García, L., Montero Montoya, R., 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ. Mol. Mutagen.* 38, 38-45.
- Shannon, C. y W. Weaver. (1949). The mathematical theory of communications. Universidad de Illinois, Urbana, Illinois, EEUU.
- Silva, V., A. Valenzuela, P. Ruiz y C. Oyarzún. (2005). *Trypanosoma humboldti* en *Schroederichthys chilensis* (Chondrichthyes, Elasmobranchii, Scyliorhinidae) como indicador no destructivo de contaminación. *Gayana* (Concepción), 69(1), 160-165.
- Smith, R. y T. Smith. (2001). Ecology. Addison Wesley.

- Smith, T. G. (1996). The genus Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal of parasitology*, 565-585.
- Smith, T. G., Kim, B., Hong, H., y S. S. Desser. (2000). Intraerythrocytic development of species of Hepatozoon infecting ranid frogs: evidence for convergence of life cycle characteristics among apicomplexans. *Journal of Parasitology*, 86(3), 451-458.
- Spaulding, S.A., Lubinski D.J., y M. Potapova. (2010). Diatoms of the United States. <http://westerndiatoms.colorado.edu>. Accessed 15 March 2014.
- Stuart, S., J. Chanson, N. Cox, B. Young, A. Rodrigues, D. Fischman y R. Waller. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions. *Worldwide Science*, 306: 1783-1786.
- Taylor B., D. Skelly, L.K. Demarchis, M.D. Slade, D. Galusha y P.M. Rabinowitz. (2005). Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. *Environmental Health Perspectives* 113: 1497-1501.
- Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and environmental safety*, 1(2), 151-173.
- Udroiu, I. (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79 201–204.
- US Environmental Protection Agency, 1988. Ambient Water Quality Criteria for Chloride. EPA PB88-175-047. USEPA, Washington, DC.
- Valenzuela, A. E., Silva, V. M, y A. E. Klempau. (2006). Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture*. 251(2-4): 596-602.
- Vences, M, Galán, P, Vieites, DR, Puente, M, Oetter, K, Wanke, S (2002). Field body temperatures and heating rates in a montane frog population: the importance of black dorsal pattern for thermoregulation.
- Venice system, (1959). The final resolution of the symposium on the classification of brackish waters. *Archives Oceanography and Limnology* 11: 243-248
- Villafañe, V.E y F.M.H. Reid. (1995). Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton. En: Alveal, K., M.E. Ferrario, E.C. Oliveira y E. Sar (Eds). *Manual de Métodos Ficológicos*. Edit. Universitaria, Concepción, pp: 169-185.
- Villalba, G., M. Blarasin y J. Coniglio. (2000). Características Geohidrológicas de la cuenca Del Arroyo El Talita, Batolito Cerro Áspero, Córdoba, Argentina. *1<sup>st</sup> Joint World Congress on Grounwater*. 21 p.
- Welsh, H., y L. Ollivier. (1998). Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's redwoods. *Ecological Applications*. 8: 1118-1132.
- Wilbur H.M. (1980). Complex life cycle. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 67-93.
- Williams, W.D., (1987). Salinization of Rivers and streams: an important environmental hazard. *Ambio* 16, 181-185.
- Young, B., S. Stuart, J. Chanson, N. Cox y T. Boucher. (2004). Joyas que están desapareciendo: El estado de los anfibios en el nuevo mundo. Nature Serve, Arlington, Virginia.
- Yucra, H.A., y P.M. Tapia. (2008). El uso de microalgas como bioindicadoras de polución orgánica en Brisas de Oquendo, Callao, Perú. *Biologist (Lima)*. 6: 41-47.
- Zalacain, M., L. Sierrasesúмага y A. Patiño. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar.*, 28: 227-236.
- Žičkus, T. (2002). The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica* 2: 197-202. Johnson PTJ, Preu ER, Sutherland DR, Romansic J, Han B, Blaustein AR (2006) Adding infection to injury: synergistic effects of predation and parasitism on salamander limb malformations. *Ecology* 87: 2227-2235

Estudios ecotoxicológicos *in situ* en redes hídricas asociadas a la actividad minera en la provincia de Córdoba, Argentina

**8 -COPIA PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**

# Trophic ecology of syntopic anuran larvae, *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) and *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae): its relation to the structure of periphyton

Favio E. Pollo<sup>1,2</sup>, Luciana Cibils Martina<sup>2,3</sup>, Clarisa L. Bionda<sup>1,2\*</sup>, Nancy E. Salas<sup>1</sup> and Adolfo L. Martino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC, ruta 36 km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

<sup>3</sup> Botánica Sistemática, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC, Argentina

Received 12 February 2015; Accepted 18 May 2015

**Abstract** – The grazing of amphibian tadpoles has a significant effect on structure and function of freshwater algal communities. The aim of this study was to evaluate the composition of the diet, the amplitude and degree of overlap of the trophic niche of tadpoles of *Rhinella arenarum* and *Hypsiboas cordobae*. We captured tadpoles using nets in pond. Food items were identified to genus level and assigned to morphological guilds. The diet of both species consisted of microalgae, with a predominance of diatoms, but representatives of Cyanobacteria, Chlorophyta, Euglenozoa, Dinzoa and Ciliophora, were also recorded. A greater abundance was observed in *H. cordobae* diet, with diversity and richness showed significant differences between species. The proportion of individuals of each guild was different in the two species. As regards the size of the taxa consumed, both species consumed a higher proportion of small organisms. The differences in the diet of these species could be explained by different behaviors for food acquisition in the water column, as *H. cordobae* tends to be nektonic and *R. arenarum* benthic. The analysis of diets suggest that the quantity of food available to the tadpole anurans is very low; this could be due to water turbidity, depth, substrate type and strong variations in conductivity in a short period of time.

**Key words:** Syntopic anuran / larval diet / microalgae / trophic niche / morphological guilds

## Introduction

The diet analysis is a tool to assess food availability in an environment, especially in those generalist habits species, and feeding strategies in syntopic species with similar behavior, however there are few studies comparing dietary overlap of amphibian larvae (Pavignano, 1990; Rossa Feres *et al.*, 2004; Do Prado *et al.*, 2009).

Amphibian larvae have a fundamental role in controlling ecosystem processes, in the regulation of primary producer's communities and as intermediaries in food webs of many environments (Connelly *et al.*, 2008; Whiles *et al.*, 2013). In addition, in some habitats, tadpoles could be a diverse and abundant component of many freshwater habitats, grazing of amphibian tadpoles has a significant

effect on structure and function of algal communities in an environment (Connelly *et al.*, 2008). Therefore the information on feeding behaviors is critical to understand whether the anuran species adjust their diets to the habitats they occupy, according to the variation in the availability of different prey (Altig *et al.*, 2007; Peltzer *et al.*, 2010) which could affect the growth and development of these organisms (Falico *et al.*, 2012).

Consequently, studies on amphibian larvae diet may represent a general measure of the offer and trophic availability of different habitats and be a tool for characterization and monitoring as bioindicator of environmental quality (Jüttner *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 2004; Díaz Quiros and Rivera Rondón, 2004; Bionda *et al.*, 2012, 2013).

Several studies have been performed about the diet of larval amphibians in central Argentina (Arana *et al.*, 2003, 2005; Bionda *et al.*, 2012, 2013). But neither of these

\*Corresponding author: [cbionda@exa.unrc.edu.ar](mailto:cbionda@exa.unrc.edu.ar),  
[claribionda@yahoo.com.ar](mailto:claribionda@yahoo.com.ar)

studies has focused on analyzing dietary overlap between species and the structure and architecture of the consumed algal community, thus becoming the first reference to Argentina, contributing significantly to the theoretical framework of the ecology of neotropical tadpoles.

The aim of this study was to evaluate the diet composition, amplitude and degree of trophic niche overlap of larval anurans of *Rhinella arenarum* Hensel, 1867 and *Hypsiboas cordobae* Barrio, 1965 and its relation to the structure of periphyton.

## Materials and methods

### Study area

The study area is located in center-south of the Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina (32°50'34"S–64°79'30"W, 1200 m elevation.). Most part of the area is constituted by plutonic base, with high fluorine content, more than double the hosting metamorphic rock (Coniglio *et al.*, 2010). This natural morphology in this area has contributed to the development of mines associate with the fluorite extraction, being the mine Cerros Negros; the only mine active at present since 1991.

The region is characterized by a climate within the domain semi-humid to semi-dry trend in the plains and mountains, with water deficit in winter (Oggero and Arana, 2012). With respect to temperatures, the annual average is 17.2 °C; the maximum is 34.0 °C.

### Species of study

*R. arenarum* presents a neotropical distribution (Frost, 2015), in a variety of habitats, including coastal environments, rural or urban areas (Lajmanovich *et al.*, 2010); while, the distribution of *H. cordobae* is restricted to highlands of Córdoba and San Luis provinces, Argentina. This restricted distribution, to the highlands of central Argentina and with a broad altitudinal range, together with the report by the IUCN (2014) as species with insufficient data, makes this species interesting for study (Baraquet *et al.*, 2013, 2015).

### Sampling

In November 2013, using a hand net, six tadpoles of both species *R. arenarum* and *H. cordobae* between Gosner stages 30–39 (1960) were collected, from artificial ponds of approximately 15 × 25 m, vegetated with *Typha* sp. where sediments precipitate due to the flotation process that uses the mine. The captured larvae were anesthetized with a solution of chloroethylene and fixed in buffer formalin.

Water temperature, pH, electrical conductivity, salinity and total dissolved solids were recorded with digital equipment TestTM 35-Series Multiparameter 35425-10.

In order to qualitatively determine the algal community present at the sampling site, three replicates of epiphyton (macrophytes) and epipelon (sediment) of the ponds were collected for identification under a 40x optical microscope.

### Analysis of the diet

Under a stereoscopic microscope complete intestine of 12 larvae was removed and their contents were analyzed (only first third) according to Bionda *et al.* (2012). For species identification, a Zeiss optic microscope was used. For taxonomic analysis, specific bibliography for each particular group was used, and names were updated according to Spaulding *et al.* (2010), Komárek and Hauer (2013) and, Guiry and Guiry (2014). The counts were performed by direct methods at 400x magnification with slide and coverslip of 24 × 50 mm following transects along the coverslip (Gómez *et al.*, 2009, Rimet and Bouchez, 2011). The counting unit was the individual (cell, coenobium or colony) and for filamentous algae a 30 µm length was counted as a single cell (Hill *et al.*, 2000). Algal density estimation was based on Villafañe and Reid (1995).

The frequency of occurrence (FO%, percentage of individuals that consumed a given category of prey) and numerical frequencies (N%) for each food item were calculated. Rank-abundance curves were constructed to analyze and show graphically the dominance of certain groups and the presence of rare taxa, and whether these relationships changed between species.

Total algal abundance was compared between species using the non-parametric Kruskal–Wallis test, because this variable did not meet the assumptions of analyses of variance (ANOVA). To describe the dietary diversity among different populations, diversity index (H) according to Shannon and Weaver (1949) was calculated. Furthermore, we measured the evenness (E) for each population diet following Magurran (1987). These structural attributes were compared using one-way ANOVAs.

Rarefaction method was performed using Estimates version 8.2.0 (Colwell, 1997) to contrast the average diet diversity and richness in populations with different sample sizes. All algal taxa were grouped in three ecological guilds, low profile, high profile and motile species proposed by Passy (2007) and Passy and Larson (2011). The low profile guild comprises species of short stature, including prostrate, adnate, solitary centrics and slow moving species. Unicellular, colonial or filamentous algae extending higher on the substrate, comprising the high profile guild; and fast-moving biraphid diatoms or flagellated soft algae the motile guild. ANOVA were performed to compare the abundance and proportion of algae assigned to each morphological guild within species.

According to Rimet and Bouchez (2011), the taxa were assigned to five classes considering its biovolume (in µm<sup>3</sup>): C<sub>1</sub> consists of taxa with less than 99 µm<sup>3</sup>, C<sub>2</sub> between 100 and 299 µm<sup>3</sup>, C<sub>3</sub> between 300 and 599 µm<sup>3</sup>, C<sub>4</sub> between 600

**Table 1.** Percent (N%) and occurrence frequencies (FO%) of the more abundant algal genera (FO > 50%) recorded in the gut contents of *Rhinella arenarum* and *Hypsiboas cordobae* tadpoles.

	<i>R. arenarum</i>		<i>H. cordobae</i>	
	N (%)	FO (%)	N (%)	FO (%)
Division Cyanobacteria				
<i>Chroococcus</i>	0.46	33	0.05	83
<i>Jaaginema 1</i>	2.09	83	5.12	100
<i>Oscillatoria</i>	1.20	33	3.36	83
Division Chlorophyta				
<i>Closteriopsis</i>	–	–	0.25	100
Division Ochrophyta				
<i>Achnanthydium</i>	34.41	100	23.48	100
<i>Cocconeis</i>	0.40	33	0.42	50
<i>Encyonema</i>	0.12	50	0.04	33
<i>Encyonopsis</i>	8.97	83	4.54	83
<i>Fragilaria</i>	1.53	50	1.17	83
<i>Gomphonema</i>	0.43	33	0.10	67
<i>Halamphora</i>	0.23	67	0.24	67
<i>Navicula</i>	8.2	100	32.31	83
<i>Nitzschia</i>	39.7	100	17.54	83
<i>Rhopalodia</i>	0.11	50	0.57	50
Phylum Euglenozoa				
<i>Euglena</i>	0.10	17	2.96	83
Phylum Dinzoa				
<i>Peridinium</i>	1.25	83	0.06	67

and 1499  $\mu\text{m}^3$  and  $C_5$  greater than 1500  $\mu\text{m}^3$ . ANOVA were performed to compare the abundance and proportion of algae assigned to each size in the diet of each species. Analyses were performed using InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

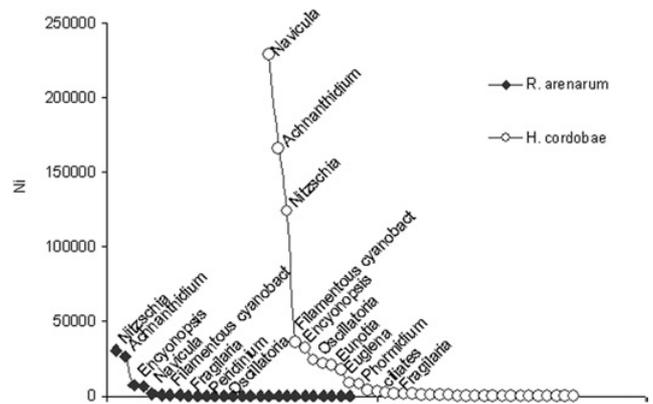
We calculated dietary overlaps using Pianka’s index (Pianka, 1973). Overlap values of 1.0 indicate identical diets or food volume, whereas overlap values of 0 indicate total dissimilarity in food items. Intermediate values are established as proposed by Peltzer *et al.* (2010) at the following levels: high (> 0.7), intermediate (0.4–0.7) or low (< 0.4).

**Results**

The previous analysis of the availability of food revealed a low algal density with *Nitzschia* sp., *Navicula* sp., *Achnanthydium* sp. and *Euglena* sp., as the most frequent genera.

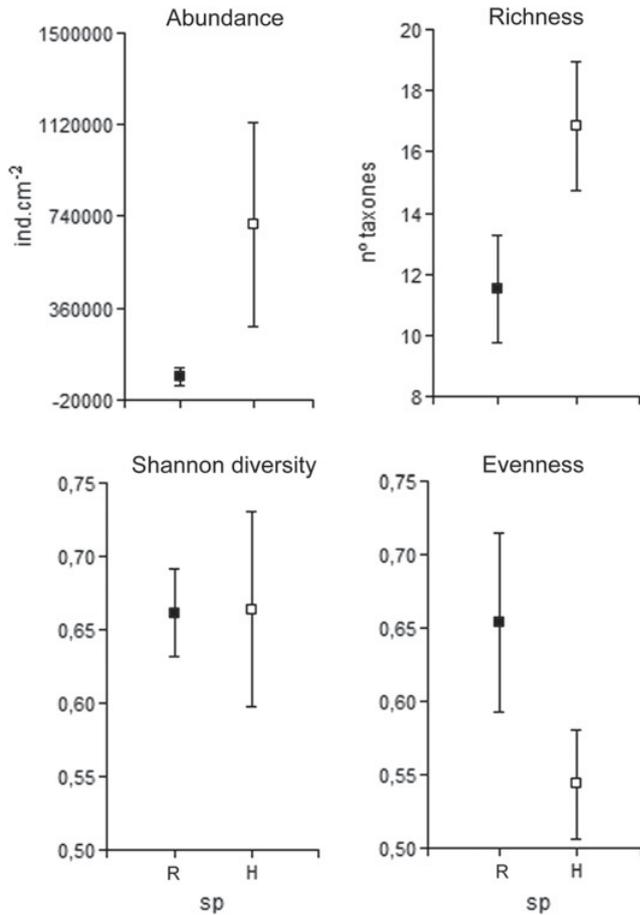
Six tadpoles for each species were analyzed. The diet of the two species consisted mainly of microalgae belonging to 44 genera (Table 1). There was a predominance of diatoms (95 and 83% *R. arenarum* and *H. cordobae*, respectively) but representatives of Cyanobacteria, Chlorophyta, Euglenozoa, Dinzoa and Ciliophora were also recorded, the last one only in *H. cordobae* diet. In a smaller proportion, plant tissue, reproductive structures of fungi and rotifers were found in the diet.

The analysis of the diet of tadpoles of *R. arenarum* and *H. cordobae* revealed that the abundance of consumed algae was very different, with greater algal density in the gut of *H. cordobae* larvae (Fig. 1). In the diet of



**Fig. 1.** Range-abundance curves of taxa recorded in the diet of *Rhinella arenarum* and *Hypsiboas cordobae*. The number of individuals is represented by  $\text{cm}^2$ . Genera with abundances higher than 1% are indicated.

*R. arenarum* the abundance of the most common genera was less than 50.000 individuals  $\text{cm}^2$ , while in larvae of *H. cordobae* the abundance of the most consumed genera was above the 100.000 individuals  $\text{cm}^2$ , 2x the consumed by the other species. It was also observed that the composition of the diet of each species was different, with different dominant species (Fig. 1). In the diet of *R. arenarum* the most abundant genera were *Nitzschia* sp. and *Achnanthydium* sp., representing almost 40% of the diet composition. However, in the diet of *H. cordobae* in addition to the genera mentioned for *R. arenarum*, *Navicula* sp., *Euglena* sp., filamentous cyanobacteria and ciliates became important.

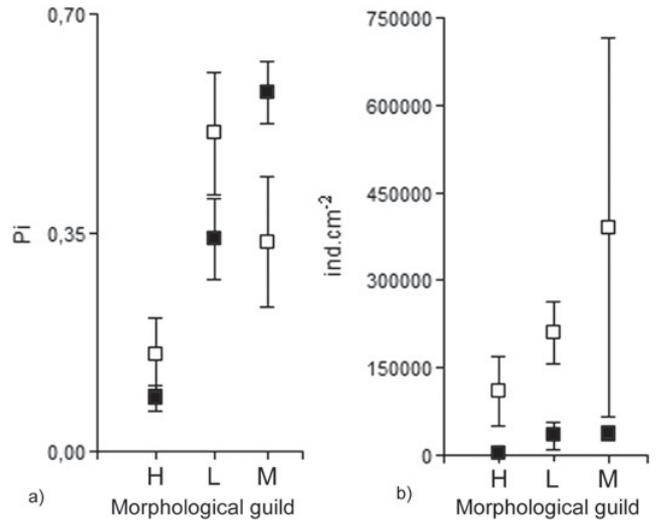


**Fig. 2.** Structural attributes of the algal community in the diet of *Rhinella arenarum* (black) and *Hypsiboas cordobae* (white) tadpoles. Means and standard errors are shown.

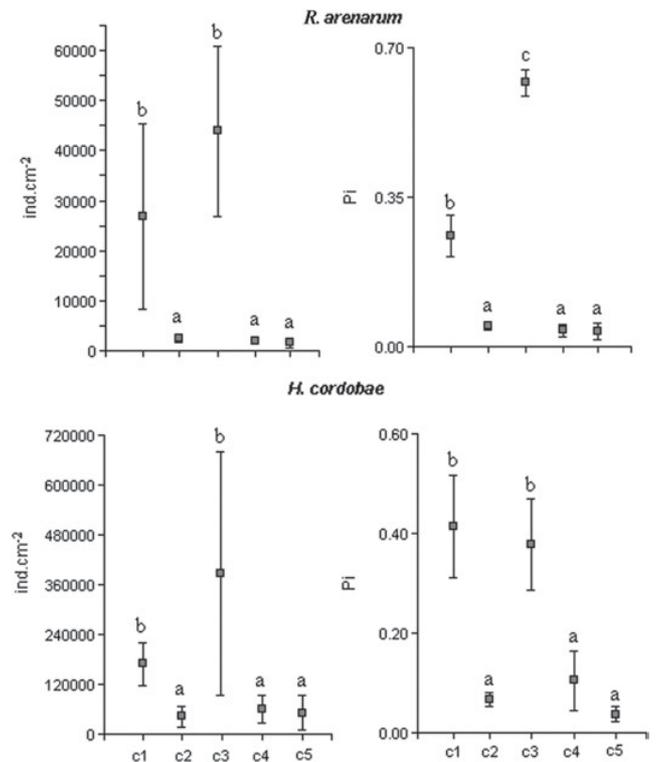
As to the structural attributes of the algal community consumed by the tadpoles a greater algal abundance was observed in the diet of *H. cordobae* (Kruskal–Wallis,  $H = 6.56$ ;  $P < 0.01$ , Fig. 2). The diversity, evenness and richness in the diet showed no significant differences between species (diversity,  $F_{1,10} = 0.001$ ;  $P = 0.97$ ; evenness,  $F_{1,10} = 2.37$ ;  $P = 0.15$  and richness  $F_{1,10} = 3.74$ ;  $P = 0.08$ ). However, the rarefaction technique revealed that the diversity and richness of consumed algae in the diet showed significant differences between species (diversity,  $F_{2,9} = 14.26$ ;  $P < 0.001$ ; richness  $F_{2,9} = 3.74$ ;  $P < 0.05$ ).

The proportion of individuals of each guild in the diet of the two species was different ( $F_{2,15} = 3.91$ ;  $P < 0.05$  for *H. cordobae* and  $F_{2,15} = 25.12$ ;  $P < 0.0001$  for *R. arenarum*, Fig. 3(a)), with a higher proportion of motile organisms and low profile in *H. cordobae* and motile organisms in the diet of *R. arenarum*. However, the density of motile organisms in the diet of *H. cordobae* was higher, but may be due to the great variability of this variable no significant differences were found (Kruskal–Wallis,  $H = 8.84$ ;  $P = 0.19$ , Fig. 3(b)).

The diet of *R. arenarum* showed greater abundance of taxa of size classes 1 and 3 (Kruskal–Wallis,  $H = 20.02$ ;



**Fig. 3.** Proportion (a) and density (b) of the organisms of morphological guilds: high profile (H), low profile (L) and motile (M) in the diet of *Rhinella arenarum* (black) and *Hypsiboas cordobae* tadpoles (white).



**Fig. 4.** Density and proportion of organisms for the different size classes (C<sub>1</sub>–C<sub>5</sub>, C<sub>1</sub> being the smallest) in the diet of *Rhinella arenarum* and *Hypsiboas cordobae* tadpoles. Means and standard errors are shown. Letters show the results of post-hoc tests, mean values with the same letter are not significantly different.

$P < 0.01$ ; Fig. 4); higher proportion of class 3 (60%) followed by organisms of size 1 (26%) ( $F_{4,25} = 80.37$ ;  $P < 0.001$ ). Similar results were found for the diet of *H. cordobae*, with greater abundance and proportion of

organisms of size classes 1 and 3 (Kruskal–Wallis for abundance,  $H = 8.91$ ;  $P < 0.05$ , and for proportions,  $H = 19.05$ ;  $P < 0.001$ ), each of these size classes accounting for around 40% of the diet.

The general niches overlap was high ( $GO = 0.964$ ) and the specific overlap indicated that *R. arenarum* overlapped intermediately to *H. cordobae* ( $SO = 0.612$ ), while *H. cordobae* had a low overlap on the diet *R. arenarum* ( $SO = 0.187$ ).

The mean values, standard deviation, minimum and maximum for the physico-chemical variables were: electrical conductivity ( $\mu\text{S}$ ) =  $1531.32 \pm 831.87$  (2.56–1991); salinity (ppm) =  $434.97 \pm 446.02$  (1.32–957); total dissolved solids (ppm) =  $109.09 \pm 21.96$  (1.05–878); pH =  $8.64 \pm 0.24$  (8.13–8.94); water temperature  $^{\circ}\text{C} = 22.72 \pm 4.18$  (16–26.5). This showed that the environment presented strong variations in the studied period, mainly due to the difference between maximum and minimum values of variables.

## Discussion

The tadpoles of species, *R. arenarum* and *H. cordobae*, was found to coexist spatially but with variation in the use of trophic niche. The taxonomic composition of the diet of both species was different, and tadpoles of *H. cordobae* consumed a greater number of organisms. Furthermore, there were differences in the proportion of morphological guilds represented in the diet of each species. *R. arenarum* consumed greater proportion of motile algae, mainly represented by *Nitzschia* sp. Instead, in the diet of *H. cordobae* a higher proportion of motile algae were observed, represented by *Nitzschia* sp., *Navicula* sp., *Euglena* sp. and ciliates, and of low profile algae, mainly due to the abundance of *Achnanthydium* sp.

The trophic spectrum of tadpoles was in agreement with that of other species of benthic and nektonic tadpoles, mainly composed of animal remains, plant remains, diatoms and sediment (Lajmanovich and Fernández, 1995; Arana *et al.*, 2003; Echeverría *et al.*, 2007; Bionda *et al.*, 2012, 2013). However, differences in resource use, type and size of prey consumed reported by the present paper suggested how species are structured to coexist in the same environment. In addition, this work represents one of the first contribution to the knowledge of the diet of syntopic amphibian larvae and its relationship to the architecture of periphyton.

The observed differences in the diet of these two species could be explained by differences in morphology (conformation of the buccal apparatus and buccopharyngeal cavity) and ecomorphological class assigned according to Altig and Johnston (1989) and McDiarmid and Altig (1999), where *R. arenarum* belongs to benthic group and *H. cordobae* to nektonic. *R. arenarum* larvae were observed grouped on plant debris floating in the water body, while larvae of *H. cordobae* swam through the water column. In this sense, Duellman and Trueb (1986) stated that partitioning of resources among anuran species may

be due to differences in their position in the water column, a consequence of morphological adaptations for exploitation of specific microhabitats.

Moreover, Rossa Feres *et al.* (2004) argued that the anuran species differ in their ability to ingest particles of different sizes, which can be another cause of partitioning of resources. However they found that the particle size did not explain the selection of food. Similarly, in our study both species consumed larger proportion of small algae, with less than  $600 \mu\text{m}^3$  biovolume, because most consumed genera, and also the most abundant in the environment, corresponded to these size categories (*Navicula*, *Nitzschia* and *Achnanthydium*).

The general trophic niche overlap between diets was high, in agreement with other studies (Pavignano, 1990; Rossa Feres *et al.*, 2004). A high overlap could be due to the competition between species by use of common resources and limited, or lack of competition or a non-selective foraging strategy, thus the most frequent items in the environment will be the most frequent items in the diet (Peltzer *et al.*, 2010). Both scenarios are possible and additional data on resource availability and species interactions are needed for assessing trophic competence (Peltzer *et al.*, 2010). As to specific overlap, our results showed that *R. arenarum* overlaid their diet intermediately with *H. cordobae*, while *H. cordobae* presented a low overlap on the diet of *R. arenarum*, suggesting that there is a partitioning of the food grade. Other authors have reported a high overlap in diets of larval amphibians; however Lajmanovich (1997, 2000) established that space and time can be much more important than resource partition in organizing tadpoles' communities. In this sense, both species could coexist as there is a significant temporal partition between their larval periods. The larvae of the genus *Hypsiboas* that inhabiting the mountains of central Argentina have a very long larval period, finding larval forms during the spring, summer, fall and even winter (Palermo, 1985). For its part *R. arenarum* larvae, possess a more limited larval period, between spring and early summer (Ceï, 1980). These characteristics suggest a significant temporal partition; however, *H. cordobae* would have a greater overlap in the larval cycle of *R. arenarum* than vice versa. However, further studies could analyze the survival and development of these larvae, and ultimately assess the success in the larval recruitment, as well as the degree of overlap or competition between both species.

Availability of prey has proven to be one of the most important factors determining the diet of amphibians, but resources are complex to measure and generally not included in studies of diet of anurans (Peltzer *et al.*, 2010). The semi-quantitative analysis of periphyton of the sampling site, that provided us an estimate of the availability of food in the ponds, revealed a low algal density, dominated by a few genera of algae. This is consistent with that recorded in the gut contents of the larvae and, as there were no preferences for some food items, confirms that their diets are good indicators of abundance and species composition of the

environment (Lajmanovich and Fernández, 1995; Bionda *et al.*, 2012).

Different studies demonstrate that grazing anurans larvae influences the periphyton, thereby acting as ecosystem engineers (Kupferberg, 1997; Mallory and Richardson, 2005; Connelly *et al.*, 2008, 2014). This influence might be negative, as a result of the elimination of algae by direct grazing causing changes to the species composition of periphyton community, or positive, due to an increase in the surface area available for periphyton can colonize given the removal of detritus and adhered matter (Baffico and Úbeda, 2006; Holomuzki *et al.*, 2010).

In both species intestinal contents presented a predominance of microalgae characteristics of anthropic environments, as some species from genera *Navicula* and *Nitzschia*, indicators of environmental conditions in various water bodies (Díaz Quiros and Rivera Rondón, 2004; Bionda *et al.*, 2012), are resistant to high electrical conductivity and organic contamination (Ramírez and Plata Díaz, 2008; Yucra and Tapia, 2008). The predominance of the genus *Euglena* could indicate elevated content of organic matter in these ponds (Fabrizi, 2010). However, taxa reported by Arana *et al.* (2003) in the diet of *H. cordobae* of the high mountains of central Argentina are characteristic of environments slightly modified by human activity.

This study represents a first approach to the assessment of food ecology in syntopic species of amphibians and their relationship with the periphyton in the region, therefore constitutes a significant contribution to the theoretical framework in ecology of neotropical tadpoles. Further research is required about the food availability in natural and impacted environments. The importance of using the diet of larval amphibians as indicators of environmental quality and adaptation strategies of species to their environment is highlighted, as well as the overlap in diets as an indicator of the degree of competition or differentiation of trophic niches in syntopic species.

*Acknowledgements.* We thank the Argentinean National Research Council for Science and Technology (CONICET), SeCyT UNRC (PPI 18/C416) y FONCyT (PICT 2012-0932). The authors gratefully acknowledge the company Fluorite Córdoba SA allowing access to the area of Los Cerros Negros mine and the provided logistic support.

## References

- Altig R. and Johnston G.F., 1989. Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies and habitats. *Herpetol. Monogr.*, 3, 81–109.
- Altig R., Whiles M.R. and Taylor C.L., 2007. What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats. *Freshwater Biol.*, 52, 386–395.
- Arana M., Salas N., Correa A. and di Tada I., 2003. Dieta de la larva de *Hyla pulchella cordobae* BARRIO, 1965 (Anura: Hylidae) en Pampa de Achala Córdoba Argentina. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp.*, 14, 1–2.
- Arana M., Correa A., Salas N. and di Tada I., 2005. Dieta de larvas de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (WEYENBERGH, 1874) (Anura, Bufonidae) de Atos Pampa, provincia de Córdoba, Argentina. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp.*, 15, 109–110.
- Baffico G.D. and Úbeda C.A., 2006. Larval diet of the frog *Alsodes gargola* (Leptodactylidae: Telmatobiinae) and some ecological considerations on its role in alpine and mountain aquatic environments in Patagonia. *Amphibia-Reptilia.*, 27, 161–168.
- Baraquet M., Salas N.E. and Martino A.L., 2013. Advertisement calls and interspecific variation in *Hypsiboas cordobae* and *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) from central Argentina. *Acta Zool. Bulg.*, 65, 479–486.
- Baraquet M., Grenat P.R., Salas N.E. and Martino A.L., 2015. Geographic variation in the advertisement call of *Hypsiboas cordobae* (Anura, Hylidae). *Acta Ethol.*, 18, 79–86.
- Bionda C., Gari N., Luque E., Salas N., Lajmanovich R., Martino A., 2012. Ecología trófica en larvas de *Rhinella arenarum* (Anura: Rhinellidae) en agroecosistemas y sus posibles implicaciones para la conservación. *Rev. Biol. Trop.*, 60, 771–779.
- Bionda C., Luque E., Gari N., Salas N.E., Lajmanovich R.C. and Martino A.L., 2013. Diet of tadpoles of *Physalaemus biligonigerus* (Leiuperidae) from agricultural ponds in the central region of Argentina. *Acta Herpetologica*, 8, 141–146.
- Blanco S., Ector L. and Becares E., 2004. Epiphytic Diatoms as water quality indicators in Spanish shallow lakes. *Vie Milieu.*, 54, 71–79.
- Cei J.M., 1980. Amphibians of Argentina, Monit, *Zool. Ital. Monogr.* 2, Nuova Serie, Firenze, Italy.
- Colwell R.K., 1997. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 5.
- Coniglio J., D'aramo F.J., Pinotti L.P., Demartis M., Agulleiro Insúa L.A. and Petrelli H.A., 2010. Control estructural de las mineralizaciones de fluorita del batolito Cerro Áspero, sierras pampeanas de Córdoba. *Rev. Asoc. Geol. Argent.*, 67, 507–520.
- Connelly S., Pringle C.M., Bixby R.J., Brenes R., Whiles M.R., Lips K.R., Kilham S. and Hurnyn A.D., 2008. Changes in stream primary producer communities resulting from large-scale catastrophic amphibian declines: can small-scale experiments predict effects of tadpole loss? *Ecosystems*, 11, 1262–1276.
- Connelly S., Pringle C.M., Barnum T., Hunte-Brown M., Kilham S., Whiles M.R., Lips K.R., Colón-Gaud C. and Brenes R., 2014. Initial versus longer-term effects of tadpole declines on algae in a Neotropical stream. *Freshwater Biol.*, 59, 1113–1122.
- Díaz Quiros C. and Rivera Rondón C.A., 2004. Diatomeas de pequeños ríos andinos y su utilización como indicadores de condiciones ambientales. *Caldasia*, 26, 381–394.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. and Robledo C.W., 2012. InfoStat versión 2012, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Do Prado V.H.M., Fonseca M.G., de Almeida F.V.R., Neechi O. Jr. and Rossa-Feres D.C., 2009. Niche occupancy and the relative role of micro-habitat and diet in resource partitioning among pond dwelling tadpoles. *S. Am. J. Herpetol.*, 4, 275–285.
- Duellman W.E., Trueb L., 1986. Biology of Amphibians, Mc Graw-Hill Inc., USA.

- Echeverría D.D., Volpedo A.V. and Mascitti V.I., 2007. Diet of tadpoles from a pond in Iguazú National Park, Argentina. *Gayana*, 71, 8–14.
- Fabrizi L., 2010. Eutrophication of water bodies introduction, Lenntech, Water treatment solutions, Accessed online 12 August 2014, <http://www.lenntech.com/espanol/Eutroficacion-de-las-aguas/introduccion.htm>.
- Falico D.A., López J.A., Antoniazzi C.E. and Beltzer A.H., 2012. Variación interpoblacional y ontogenética en la dieta de la rana llorona *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leiuperidae). *Rev. Mex. Biodivers.*, 83, 1187–1193.
- Frost D.R., 2015. Amphibian species of the world, American Museum of Natural History, New York, Accessed online 23 February 2015, <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>.
- Gómez N., Donato J.C., Giorgi A., Guasch H., Mateo P. and Sabater S., 2009. La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos. In: Elosegí A. and Sabater S. (eds.), *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Fundación BBVA, España, 219–242.
- Gosner K., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16, 183–190.
- Guiry M.D. and Guiry G.M., 2014. AlgaeBase, World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, Accessed online 20 March 2014, <http://www.algae-base.org>.
- Hill R.H., Herlihy A.T., Kaufmann P.R., Stevenson R.J., McCormick F.H. and Johnson C.R., 2000. Use of periphyton assemblage data as an index of biotic integrity. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 19, 50–67.
- Holomuzki J.R., Feminella J.W. and Power M.E., 2010. Biotic interactions in freshwater benthic habitats. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 29, 220–244.
- IUCN, 2014. Conservation International, and NatureServe. An analysis of amphibians on the 2008 IUCN red list, Accessed online 6 July 2014, <http://www.iucnredlist.org/amphibians>.
- Jüttner I., Rothfritz H. and Ormerod S.J., 1996. Diatoms as indicators of river quality in the Nepalese Middle Hills with consideration of the effects of habitat specific sampling. *Freshwater Biol.*, 36, 475–486.
- Komárek J. and Hauer T., 2013. CyanoDR.cz – On-line database of cyanobacterial genera, World-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, Accessed online 16 March 2014, <http://www.cyanodR.cz>.
- Kupferberg S., 1997. Facilitation of periphyton production by tadpole grazing: functional differences between species. *Freshwater Biol.*, 37, 427–439.
- Lajmanovich R.C., 1997. Alimentación de larvas de anuros en ambientes temporales del sistema del Río Paraná, Argentina. *Doñana Acta Vertebrata, Sevilla.*, 24, 191–202.
- Lajmanovich R.C., 2000. Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia.*, 25, 71–79.
- Lajmanovich R.C. and Fernández V.C., 1995. Alimentación de larvas de *Bufo arenarum* Hensel, 1867 (Amphibia, Bufonidae) en ambientes del Río Paraná. *Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Chile.*, 45, 7–18.
- Lajmanovich R.C., Peltzer P., Junges C.M., Attademo A., Sanchez L.C. and Bassó A., 2010. Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná river flood plain: implication for ecological risk assessment of soybean crops. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 73, 1517–1524.
- Magurran A., 1987. *Ecological Diversity and its Measurements*, EEUU: Vedral, Princeton, Nueva Jersey.
- Mallory M.A. and Richardson J.S., 2005. Complex interactions of light, nutrients and consumer density in a stream periphyton-grazer (tailed frog tadpoles) system. *J. Anim. Ecol.*, 74, 1020–1028.
- McDiarmid R.W. and Altig R., 1999. *Tadpoles: the Biology of Anuran Larvae*, University of Chicago Press, Chicago, EEUU.
- Oggero A.J. and Arana M.D., 2012. Inventario de las plantas vasculares del sur de la zona serrana de Córdoba, Argentina. *Hoehnea*, 39, 171–199.
- Palermo M.A., 1985. *Anfibios y Reptiles fauna Argentina*, Centro editor de América Latina S.A.
- Passy S.I., 2007. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behaviour a long nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquat. Bot.*, 86, 171–178.
- Passy S.I. and Larson C.A., 2011. Succession in stream biofilms is an environmentally driven gradient of stress tolerance. *Microb. Ecol.*, 62, 414–424.
- Pavignano I., 1990. Niche overlap in tadpole populations of *Pelobates fuscus insubricus* and *Hyla arborea* at a pond in north western Italy. *Boll. Zool.*, 57, 83–87.
- Peltzer P.M., Attademo A.M., Lajmanovich R.C., Junges C.M., Beltzer A.H. and Sanchez L.C., 2010. Trophic dynamics of three sympatric anuran species in a soybean agroecosystem from Santa Fé Province, Argentina. *Herpetological J.*, 20, 261–269.
- Pianka E.R., 1973. The structure of lizard communities. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 4, 53–74.
- Ramírez C.A.M. and Plata Díaz Y., 2008. Diatomeas perifíticas en diferentes tramos de dos sistemas lóticos de alta montaña (páramo de Santurban, norte de Santander, Colombia) y su relación con las variables ambientales. *Acta Biol. Colomb.*, 13, 199–216.
- Rimet F. and Bouchez A., 2011. Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: Lotic mesocosm approaches. *Ecol. Indic.*, 11, 489–499.
- Rossa Feres D.C., Jim J. and Gonçalves Fonseca M., 2004. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). *Rev. Bras. Zool.*, 21, 745–754.
- Shannon C. and Weaver W., 1949. *The Mathematical Theory of Communications*, EEUU, Universidad de Illinois, Urbana, Illinois.
- Spaulding S.A., Lubinski D.J. and Potapova M., 2010. Diatoms of the United States, Accessed online 15 March 2014, <http://westerndiatoms.colorado.edu>.
- Villafañe V.E. and Reid F.M.H., 1995. Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton. In: Alveal K., Ferrario M.E., Oliveira E.C. and Sar E. (eds.), *Manual de Métodos Ficológicos*, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, 169–185.
- Whiles M.R., Hall R.O. Jr., Dodds W.K., Verburg P., Huryn A.D., Pringle C.M., Lips K.R., Kilham S.S., Colón Gaud C., Rugenski A. T., Peterson S. and Connelly S., 2013. Disease-driven amphibian declines alter ecosystem processes in a tropical stream. *Ecosystems*, 16, 146–157.
- Yucra H.A. and Tapia P.M., 2008. El uso de microalgas como bioindicadoras de polución orgánica en Brisas de Oquendo, Callao, Perú. *Biologist (Lima)*, 6, 41–47.



## Assessment *in situ* of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine

Favio E. Pollo<sup>a,b,\*</sup>, Pablo R. Grenat<sup>a,b</sup>, Manuel A. Otero<sup>a,b</sup>, Nancy E. Salas<sup>a</sup>, Adolfo L. Martino<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ecología-Educación Ambiental, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC, Ruta 36km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

<sup>b</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 June 2016

Received in revised form

2 August 2016

Accepted 5 August 2016

#### Keywords:

Genotoxicity

Mine fluoride

Blood biomarkers

Body conditions

*Hypsiboas cordobae*

### ABSTRACT

Non-lethal biological techniques such as blood biomarkers have gained attention due to their value as early signals of anthropic effects of contamination representing significant tools to evaluate ecosystems health. We evaluate and characterize *in situ* genotoxicity of water samples collected from aquatic ecosystems around a fluorite mine using amphibian frogs *Hypsiboas cordobae* as bioindicator species complemented with 16 physicochemical parameters. Four stations associated with fluorite mine sampling were sampled: a stream running on granitic rock with natural high fluorite content; two streams both running on metamorphic rock with low fluorite content; and an artificial decantation pond containing sediments produced by fluorite flotation process with high variation in physicochemical parameters. We analysed the blood of tadpoles and adults of *H. Cordobae*, calculated frequencies of micronuclei, erythrocyte nuclear abnormalities, mitosis, immature and enucleated erythrocytes. Individuals were measured and weighed and body condition was calculated. The results of this study indicate that individuals of decantation pond are exposed to compounds or mixtures which are causing cell damage when compared to those that were collected of stream. Larval stage was more vulnerable than the adult phase and it could be related mainly to the higher exposure time to xenobiotics, which can penetrate easily by skin, mouth and gills; additionally this site offers a reduced availability of food than other sites. Therefore, chronic exposure to pollutants could derive in degenerative and neoplastic diseases in target organs. Moreover these individuals may experience reproductive and behavioral disturbances which could lead to population decline in the long term.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Degradation of freshwater resources is a world-wide growing concern (Antunes et al., 2007; Marques et al., 2008). Many are the causes of such degradation that go from agricultural practices (Bionda et al., 2011, 2013; Babini et al., 2015) to industrial activities such as mining (Castro et al., 2003; Marques et al., 2008; Antunes et al., 2008). Mining activity is a source of physical, chemical, biological and landscape alterations. Evaluation of environmental quality, particularly in aquatic ecosystems, has traditionally been based on physicochemical measurements of water, but not necessarily provides adequate information on exposure and response

\* Corresponding author at: Ecología-Educación Ambiental, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC, Ruta 36km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

E-mail addresses: [faviopollo@gmail.com](mailto:faviopollo@gmail.com), [fpollo@exa.unrc.edu.ar](mailto:fpollo@exa.unrc.edu.ar) (F.E. Pollo).

of living organisms to pollution (Antunes et al., 2008; Lavoie et al., 2012). Therefore, the development of complementary monitoring methods is a priority. In this sense, the use of non-lethal biological techniques such as analysis of blood biomarkers have gained attention due to their unquestionable value as early signals of adverse effects of contamination, because provide an estimation of biological exposure to genotoxic pollutants (Vera Candiotti et al., 2010). These effects can be monitored using a broad range of assays, including analysis of micronuclei frequency and nuclear abnormalities, which are the most frequently used methods for detecting cytogenetic and genotoxic effects in nucleated erythrocytes (Aylon and Garcia-Vazquez, 2000; da Silva Souza and Fontanetti, 2006; Machado da Rocha, 2011; Pollo et al., 2012; de Arcaute et al., 2014).

Hence, changes in biological endpoints and blood biomarkers as responses of multiple changes occurred in the test organisms can turn into a consistent warning signal of environmental

modification level, and have been considered a priority in the characterization of environmental risk for amphibian (Lajmanovich et al., 2010; Peltzer et al., 2013; Babini et al., 2015; Pollo et al., 2015a). It is well-known that amphibians have a great potential as bioindicators, and especially their aquatic early-life stages are very sensitive to contaminants (Rowe et al., 1992; Marques et al., 2013; Babini et al., 2015). Furthermore, anurans have a permeable skin that can more easily absorb moisture and substances dissolved in water. On the other hand, amphibians are one of the groups extremely important in the trophic chain. Depending on habitat and life stage, amphibian may occupy both the role of prey and top predators being a key element in the accumulation and transfer of toxic substances between aquatic and terrestrial environments (Marques et al., 2013).

*Hypsiboas cordobae* (Barrio, 1965) has a distribution restricted to highlands of Córdoba and San Luis provinces, in central Argentina, generally associated to slightly disturbed habitat. This species presents ecological characteristics that are essential for the election of a sentinel species to ensure the detection of local perturbations: present in abundance in the study area, have a low rate of migration, and be limited to a small space (Flickinger and Nichols, 1990).

The aim of the current study was to determine and characterize *in situ* the genotoxicity in natural and artificial surface waters associated with a fluorite mine from central Argentina, using *Hypsiboas cordobae* as bioindicator species. Because of absence of other important sources of contaminants (e.g. agrochemicals, sewage, livestock breeding) the study area can be regarded as a “field laboratory” offering an opportunity for the assessment of toxicity under realistic conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area and site selection criteria

The study area is located in a large granitic batholith, Cerro Áspero (440 km<sup>2</sup>, altitude 1200 m.a.s.l) in the centre-south region of Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina. In this area the main deposits of epithermal fluorite of Sierras Pampeanas are located (Coniglio, 2006). The Sierras Pampeanas are constituted mostly by metamorphic plutonic basement, composed mainly of coarse-grained metamorphic rocks (gneisses and migmatites), and intruded into the Lower Paleozoic by granitic batholiths (Cantú and Degiovanni, 1984). These batholiths have an average content of F<sup>-</sup> of 1.210 ppm, which is two times higher than the host metamorphic rocks and that of other non-mineralized granites of the Sierras de Córdoba (Coniglio et al., 2006).

This natural formation allowed the installation of mines in the area being the Los Cerros Negros mine the only active in Argentina since 1991. The effluent from the treatment of mineral ending in a series of artificial ponds (earth dams) of approximately 15 m by 25 m, vegetated with *Typha* sp. In these artificial ponds precipitate sediments produced by fluorite flotation process.

Associated with this area, the basin of stream “Los Cerros Negros” with an area of 10 km<sup>2</sup> circulates on granitic rock from west to east. Near the fluorite mine, it receives the stream “Los Vallecitos” that is born and runs through metamorphic rock and as well as without number of small streams that finally flows into the river “Guacha Corral”, the most important water course in this area (Fig. 1).

The chemical characterization of surface water made in this area indicate that the fluoride ion is found in concentrations less than 0.35 mg/l for streams belonging to metamorphic environments, while streams circulating in granitic environments have an average concentration of 0.90 mg/l (Coniglio, 2006). This is due to,

fluoride can be transferred from these granitic rocks to water through dissolution (Chuah et al., 2016).

Considering the data presented above, four sampling stations were selected: (I) Las Hylas (LH) stream and (II) Los Vallecitos stream (LV), both which runs on metamorphic rock with low fluorite content; (III) Los Cerros Negros stream (CN), which runs on granitic rock with a high fluorite content and (IV) artificial decantation ponds (DP), containing sediments produced by fluorite flotation process. In all sites the presence of populations of *Hypsiboas cordobae* was previously detected (Fig. 1).

### 2.2. Organism's collection

15–20 individuals (adults and tadpoles) of *H. cordobae* (Anura, Hylidae) were collected in each site during the period of activity of the species (September to April).

The adult individuals were found by visual encounter surveys (Heyer et al., 1994) and captured by hand. In these individuals were recorded: sex, using external secondary sexual characters (black vocal sacs and vocalizations for males, and eggs readily visible through the abdomen skin for females); total length (Snout-vent length – SVL) using a manual Somet Inox Extra Vernier caliper (0.01 mm); and weight, using a Mettler balance (P11N0–1000 g).

Tadpoles of *H. cordobae* were collected using a hand net. Subsequently, tadpoles were anesthetized by immersion in a solution at 0.05% of MS222 or Methanesulfonate Salt (3-Aminobenzoic Acid Ethyl Ester Sigma-Aldrich™), and were recorded: development stage (following Gosner, 1960); total length (TL; length from the snout to the tail end), using a manual Somet Inox Extra Vernier caliper (0.01 mm); and weight, using a Mettler balance (P11N0–1000 g).

The body condition (BC) of all individuals collected was calculated according to Jakob et al. (1996) that relates weight and total length, giving an estimate of nutritional state.

### 2.3. Blood sampling

Previously before release, blood samples were obtained from the angularis vein (Nöller, 1959; Martino and Sinsch, 2002) of each adult specimen. In tadpoles, the blood was obtained by cardiac puncture (Babini et al., 2015). Smears of fresh blood were air-dried, fixed and stained using May Grunwald-Giemsa (Dacie and Lewis, 1984).

### 2.4. Blood cell morphology

Two thousand erythrocytes per individual (adult and tadpoles) were examined by a single observer using a microscope at 1000 × magnification (Zeiss Primo Star iLED) and the results were expressed per 1000 cells (%).

Genotoxicity was tested using micronuclei (Mn) and erythrocyte nuclear abnormalities (ENA), carried out in mature peripheral erythrocytes according to the procedures of Fenech (2000) and Carrasco et al. (1990) respectively. Four ENAs were considered: notched, binucleated, lobed and blebbed (Pollo et al., 2015a). The results were expressed as ENA mean frequency (% of the sum of all abnormalities observed (Guilherme et al., 2008; Lajmanovich et al., 2014). In addition, frequencies of enucleated erythrocytes (EN) and in mitotic division (M) were calculated.

Immature erythrocyte frequency (IE) was estimated in order to assess alterations on the haematological dynamics. The distinction between mature erythrocyte (ME) and immature erythrocyte (IE) was made following Ghillerme et al. (2008): IE have a bluish-grey cytoplasm and the nucleus is rounder and larger than ME.

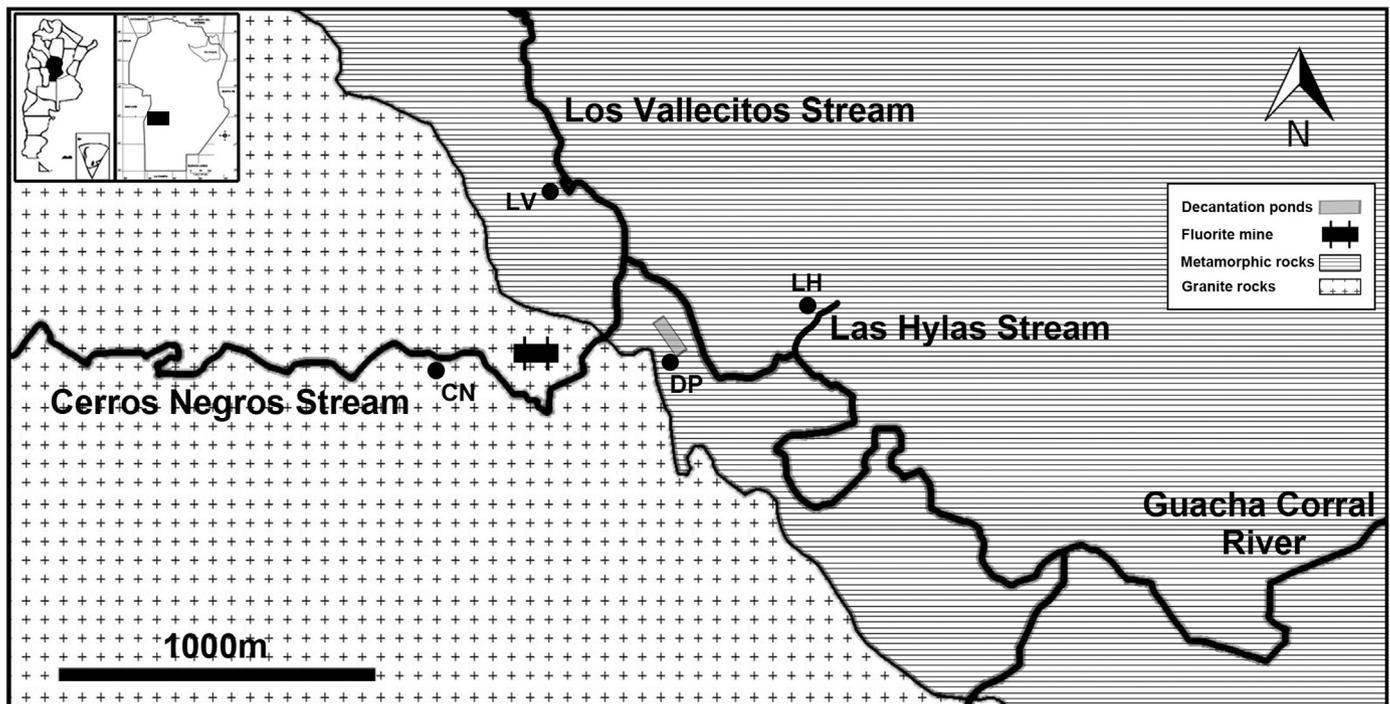


Fig. 1. Location of sampling sites in the centre-south region of Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina. Black point indicates the sampling sites.

## 2.5. Water parameters

Water samples for physical and chemical analyses were collected from all sites in 0.5 L plastic bottles. Samples were analyzed for Cl, Na, K, Ca, Mg and F and hardness (based on calcium and magnesium total content) by the area of Hydrology, Department of Geology, National University of Río Cuarto, using standard methods (APHA-AWWA, 1999). Furthermore, water temperature, pH, electrical conductivity, total dissolved solids and salinity were measured *in situ*, using a digital multiparameter 35-Series 35425–10 tests (Oakton Instruments 625E Bunker Court Vernon Hills, IL 60061, USA). Dissolved oxygen was measured using a meter HD3030.

## 2.6. Statistical analysis

All data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Data set from different treatments were checked for normality (Shapiro-Wilks test) and homogeneity of variances (Levene test). A comparative analysis of environmental variables was performed. Water temperature, pH and dissolved oxygen (%) were compared using one-way ANOVAs. Conductivity, Salinity and TDS were compared between sites using a non parametric Kruskal–Wallis test, because these variables did not meet the assumptions of the ANOVA.

Weight (W) and snout–vent length (SVL) were log-transformed. Measures of tadpole and adult weights were regressed on SVL and the residual distances of individual points from the regression line were taken as an estimator of body condition index (Jakob et al., 1996; Wood and Richardson, 2009). Then, differences in body condition (BC) of tadpoles and adults between treatments were analyzed by ANOVA. All differences were considered significant at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using InfoStat (Di Rienzo et al., 2012).

Canonical correspondence analysis based on water parameters, genotoxicity and body condition of tadpoles and adults was performed following Babini et al. (2016). The analysis was performed using Canoco for Windows 4.5, and the TRIPLLOT was performed

with Canodraw for Windows (ter Braak and Smilauer, 2002).

## 3. Results

### 3.1. Physicochemical analysis of surface water

Physicochemical variables and ion concentration in water of each sampling site are shown in Table 1. Water temperature ( $p < 0.001$ ), pH ( $p < 0.001$ ) and dissolved oxygen ( $p < 0.05$ ) showed significant differences between sites. Water pH values were similar in streams circulating in metamorphic environments (LH and LV) while CN, which runs on granitic rock, showed a neutral pH. Conductivity was extremely high in the decantation pond samples (Kruskal–Wallis,  $p < 0.0001$ ) in comparison with other sites (Table 1). Water salinity (Kruskal–Wallis  $p < 0.0001$ ) and TDS (Kruskal–Wallis,  $p < 0.001$ ) also varied among sites (Table 1).

### 3.2. Blood biomarkers

The mature erythrocytes of *H. cordobae* adults were elliptical with a centrally located oblong nucleus while in tadpoles a spherical shape was observed. Micronuclei, ENAs, mitotic, immature and enucleated erythrocytes were observed in all the sites (Fig. 2).

Sex influence on micronuclei (Mn), nuclear abnormalities (ENA), mitotic erythroid (M), immature (IE) and enucleated erythrocytes (EN) frequencies, using SVL as covariable was evaluated but it was not statistically significant for any site ( $p > 0.05$ ). Consequently, for subsequent analyses we combined males and females in a single sample per site.

Frequencies of Mn, ENA, M, IM and EN (Table 2) were compared between adult and tadpoles within each site.

In adults, Mn and IM frequencies were higher to DP and CN in relation to LV and LH sites. This difference was not significant for IM ( $p = 0.30$ , Table 2), Mn ( $p = 0.19$ ). This relationship was also found in tadpoles and the difference was statistically significant

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

	Sites			
	LH	LV	CN	DP
Temperature Water (T°W)	18.67 ± 2.63	19.17 ± 2.73	20.01 ± 2.60	23.20 ± 4.15*
pH	8.20 ± 0.25	8.30 ± 0.24	7.70 ± 0.34	8.50 ± 0.32*
SDT (ppm)	106.55 ± 20.58	78.57 ± 16.16	35.51 ± 17.43	251.19 ± 374.78*
Salinity (S) ppm	72.24 ± 13.7	54.75 ± 10.61	26.46 ± 8.92	476.23 ± 382.01*
Conductivity (Cond) µS/cm	153.91 ± 25.22	112.50 ± 24.50	49.04 ± 23.48	1495.81 ± 643.99*
Dissolved Oxygen (O) %	71.40 ± 9.01	92.30 ± 17.18	94.90 ± 12.16	69.93 ± 9.07
Hardness CO <sub>3</sub> Ca (ppm)	82.00 ± 2.83	54.00 ± 5.66	20.00 ± 5.70	74.00 ± 8.50
CO <sub>3</sub> mg/l	0.00 ± 0.00	1.80 ± 2.55	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
HCO <sub>3</sub> mg/l	90.25 ± 24.40	70.65 ± 7.99	22.50 ± 7.10	375.00 ± 240.40
Sulphates (SO <sub>4</sub> <sup>=</sup> ) mg/l	15.70 ± 9.48	25.00 ± 0.28	8.25 ± 1.60	102.05 ± 30.20
Chloride (Cl <sup>-</sup> ) mg/l	5.00 ± 0.99	3.60 ± 0.99	2.9 ± 0.00	378.6 ± 232.40
Sodium (Na <sup>+</sup> ) mg/l	5.55 ± 2.90	7.30 ± 0.99	5.65 ± 1.50	422.65 ± 277.40
Potassium (K <sup>+</sup> ) mg/l	0.85 ± 0.21	0.85 ± 0.21	0.30 ± 0.00	9.60 ± 2.10
Calcium (Ca <sup>++</sup> ) mg/l	22.40 ± 0.00	15.6 ± 5.09	4.40 ± 0.60	18.40 ± 1.10
Magnesium (Mg <sup>++</sup> ) mg/l	4.40 ± 3.39	3.65 ± 1.77	2.20 ± 1.00	6.85 ± 2.80
Fluoride (F <sup>-</sup> ) mg/l	0.20 ± 0.00	0.25 ± 0.07	1.90 ± 1.00	14.20 ± 3.70

LH=stream Las Hylas; LV=stream Los Vallecitos; CN=stream Los Cerros Negros; DP=decantation pond. Mean ± standard deviation.

\*  $p < 0.05$ .

for both biomarkers (Kruskal-Wallis, Mn  $p < 0.01$ ; IM  $p < 0.001$ ; Table 2).

ENA frequency of *H. cordobae* adults increased significantly in DP respect to the remaining sites (Kruskal-Wallis,  $p < 0.01$ ). This relation was also found for tadpoles (Kruskal-Wallis,  $p < 0.0001$ ). Eucleate cell frequency in tadpoles was higher in DP but this difference was not statistically significant (Kruskal-Wallis,  $p = 0.43$ ).

### 3.3. Morphological analysis in tadpoles and adults

Mean SVL and weight of males, females and tadpoles are shown in Table 3. We found significant differences in weight of males among sites ( $F_{3,51} = 23.91$   $p < 0.001$ ) but not in females ( $F_{2,10} = 1.34$   $p = 0.30$ ). Snout-vent length differed between sites in both females ( $F_{2,10} = 4.65$   $p < 0.05$ ) and males ( $F_{3,51} = 23.91$   $p < 0.01$ ) (Table 3). Body condition (BC) was statistically significant between sites for males ( $F_{3,51} = 7.65$   $p < 0.01$ ) but there was no differences in females ( $F_{2,10} = 2.15$   $p > 0.05$ ). The smaller BC was observed in individuals from LH stream while individual with higher BC were found in DP.

All tadpoles were between stages 27–31 (Gosner, 1960). There were significant differences between sites for total length ( $F_{3,73} = 31.78$   $p < 0.001$ ) and weight ( $F_{3,73} = 32.51$   $p < 0.001$ ). Tadpoles from DP showed the lower total length, weight (Table 3), and body condition ( $F_{3,73} = 6.14$   $p < 0.001$ ).

### 3.4. CCA

Canonical correspondence analysis (CCA) indicated that the accumulated inertia of ratio between water parameters and biological variables of tadpoles in the first axis was 49.9%. Collinearity was detected between conductivity, salinity, and TDS, so TDS was removed from the analysis. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and CO<sub>3</sub> were removed from the analysis because did not contribute significantly in a previous analysis.

The TRIPLLOT (Fig. 3) shows that the first axis separates the LV and LH sites of the CN and DP sites. Magnesium, pH, Calcium and water hardness had an inverse relation to the rest of water parameters.

DP was related with water temperature and Cl<sup>-</sup> and F<sup>-</sup> concentrations and these were associated with enucleated and mitotic erythrocytes in tadpoles and micronucleus in tadpoles and adults.

LH and LV streams had relation to calcium concentration and hardness and these variables were associated principally with erythrocyte nuclear abnormalities in tadpoles and adults.

## 4. Discussion

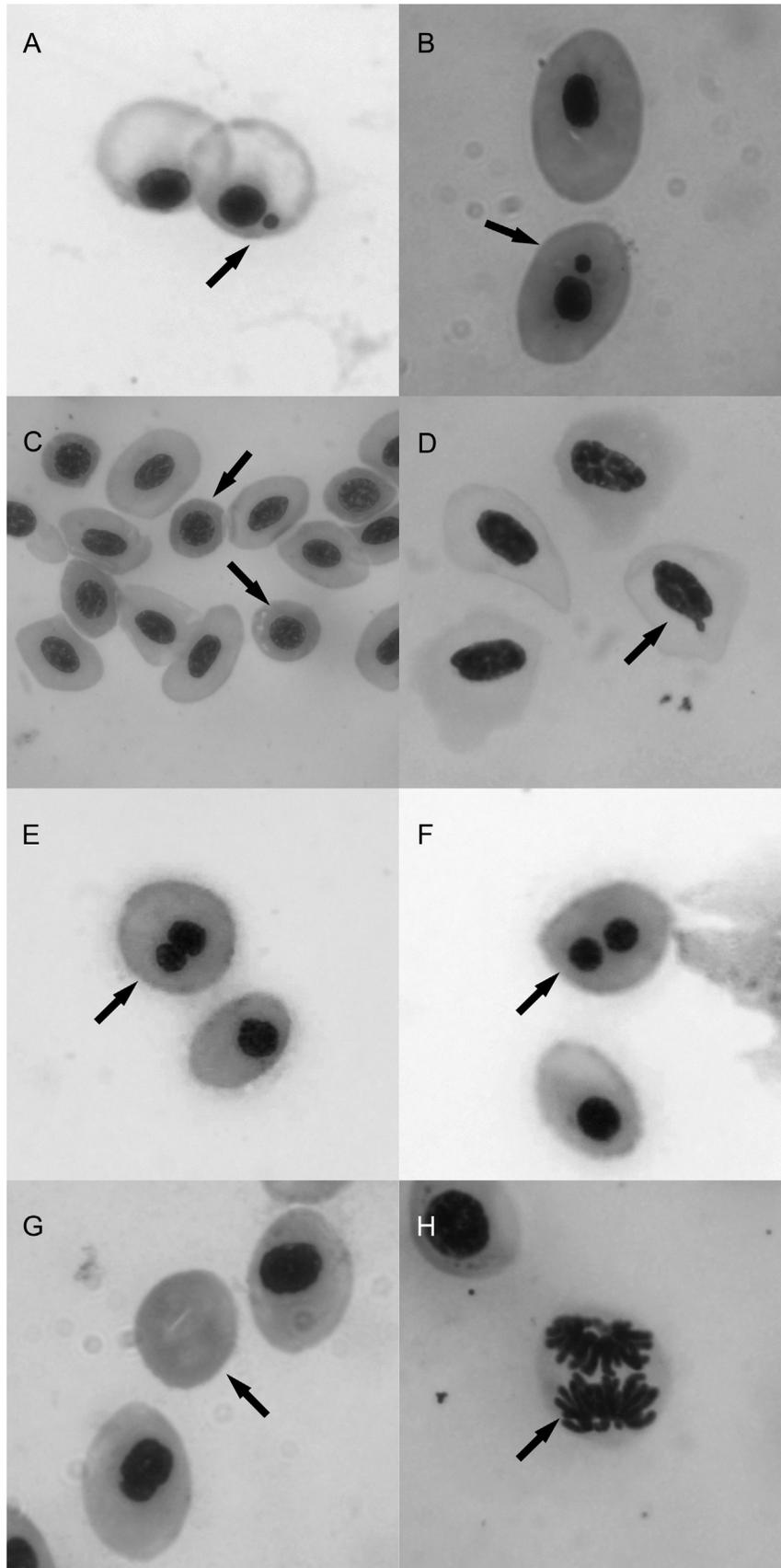
This work provides the first data on the genotoxicity *in situ* on anurans inhabiting water surfaces associated with a fluorite mine. Toxicity data on fluoride effluents are limited, and most information is only available from laboratory assays with fluoride solutions at different concentrations (Goh and Neff, 2003; Lihong et al., 2011; Cao et al., 2013; Chai et al., 2016). *In situ* assays have become popular tools in aquatic toxicology and their use as providers of site-specific toxicological information is widely recommended (Castro et al., 2003; Antunes et al., 2008). Furthermore, the evaluation of pollutant effects on natural exposed organisms give information about the health of the environment (Hoffman et al., 2010) generating more realistic and toxicologically relevant data (Marques et al., 2013).

### 4.1. Physicochemical characterization of sites and the influence on organisms

Decantation ponds (DP) are artificial environments that receive effluents from the industrial process of fluorite flotation. During this process the water is heated to 28 °C, and its pH is modified using calcium carbonate. After the sediment is decanted, the water returns to the factory to restart the process, without making contact with any natural water course. As expected, DP water samples showed the highest ion concentration and conductivity, which may be explained by the formation of complex ionic forms that precipitate on the sludge. The frog population inhabiting the DP was chronically exposed to a complex mixture of compound and high pH values by direct contact with the effluent.

In our study, pH differed among sites, with DP showing the most basic values (8.5), near of optimal limits to growth, survival and normal development reported for amphibians ( $6 < \text{pH} < 9$ ) (Addy et al., 2004; García and Fontúrbel, 2003; Gauthier et al., 2004). Dissolved oxygen showed normal values for development of amphibians in all sites ( $\geq 60\%$ ; Gauthier et al., 2004).

Fluoride is an essential element for all animals. However, it is also recognized worldwide as serious inorganic contaminant in



**Fig. 2.** Erythrocytes in blood of *Hypsiboas cordobae*: (A) tadpole erythrocyte micronucleus and (B) adults erythrocyte micronucleus; (C) mature and immature erythrocyte (D) lobed nuclei (E) blebbed nuclei (F) binucleated cell; (G) enucleated (H) mitotic erythrocyte. May Grünwald-Giemsa, 100 × .

**Table 2**

Frequencies of micronuclei (Mn), nuclear abnormalities (ENAs), mitotic erythroid (M), immature erythrocytes (IM) and enucleate cells (EN) in tadpoles (Ta) and adults (Ad) of *Hypsiboas cordobae*.

Sites	n	% Mn	% ENAs	% M	% IM	% EN
LH	20 Ta	0.32 ± 0.51	8.53 ± 5.64	2.80 ± 5.09	14.85 ± 7.17	3.42 ± 3.30
	21 Ad	0.08 ± 0.20**	3.91 ± 2.85	0.12 ± 0.43	4.52 ± 5.95	0.54 ± 0.89
DP	20 Ta	1.40 ± 1.35	10.66 ± 7.04	1.77 ± 1.69	13.5 ± 10.27	5.64 ± 6.44
	20 Ad	0.36 ± 0.59	8.60 ± 5.34**	1.17 ± 1.59	14.86 ± 19.85	1.07 ± 1.77
CN	17 Ta	1.42 ± 1.09	1.74 ± 2.59**	0.86 ± 1.13	15.32 ± 10.9	4.09 ± 4.40
	14 Ad	0.39 ± 0.85	3.56 ± 2.08	1.39 ± 1.33**	43.41 ± 46.25	0.44 ± 0.68
LV	20 Ta	0.90 ± 1.36	10.14 ± 6.49	0.82 ± 1.39	7.69 ± 4.52**	2.36 ± 1.84
	13 Ad	0.21 ± 0.61	4.50 ± 3.27	0.45 ± 0.95	22.36 ± 26.09	0.21 ± 0.39

LH=Las Hylas stream; DP=Decantation Ponds; CN=Los Cerros Negros stream; LV=Los Vallecitos stream; n=sample size, %=frequency per one thousand.

\*\* < 0.01.

**Table 3**

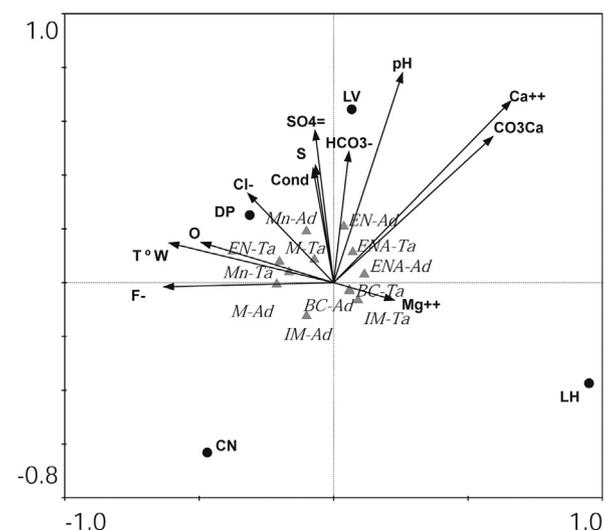
Mean values ± standard deviation of weigh and snout-vent length of adults and tadpoles of *Hypsiboas cordobae*.

Sites	n	Weigh (g)	Snout-vent length (mm)
LH	20 Ta	1.22 ± 0.70	47.09 ± 11.31
	4 ♀	9.50 ± 5.45**	45.79 ± 6.36
	17 ♂	7.06 ± 1.25***	42.32 ± 3.57***
DP	20 Ta	0.42 ± 0.15***	37.16 ± 5.93***
	5 ♀	13.60 ± 1.52	52.40 ± 2.07
	15 ♂	10.53 ± 1.96	48.20 ± 3.06
CN	17 Ta	1.18 ± 0.40	41.89 ± 8.02
	0 ♀	–	–
	14 ♂	9.00 ± 2.45	51.49 ± 3.61
LV	20 Ta	2.14 ± 0.73	63.99 ± 10.47
	4 ♀	13.00 ± 1.83	53.95 ± 2.95
	16 ♂	8.94 ± 1.98	50.12 ± 2.39

LH=Las Hylas stream; DP=Decantation Ponds; CN=Los Cerros Negros stream; LV=Los Vallecitos stream; n=sample size, Ta=tadpoles. \*p < 0.05

\*\* p < 0.01.

\*\*\* p < 0.001.



**Fig. 3.** TRIPLLOT (first two CCA axes) showing the sites (circles), the biological variables (triangles), and the water parameters (arrows) representing the correlation of the physicochemical variables with the canonical axes. See Table 1 and Table 2 for definition of variables.

water and cause of toxicity for many aquatic organisms (Camargo, 2003). F<sup>-</sup> content at all sites were above the limit suggested (0.12 mg/l) by the Canadian Council of Ministers of Environment

(CCME, 2002). CN stream and DP showed higher concentrations than the value proposed by Camargo (2003) for protection of aquatic biota in freshwater ecosystems (0.5 mg/l) and the value suggested by the Argentinian government (1.4 mg/l - Law 24,051, 1992).

On the other hand, the high concentration of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> found in DP could be a direct outcome of the mining activity, which can increase 30–40 times this value, impacting on salinity and conductivity (Cañedo Argüelles et al., 2013). A high salinity directly influence on freshwater organisms because they need to maintain an internal osmotic pressure relative to the medium in which they live. Therefore, when the salt concentration of the medium becomes too high the osmoregulatory mechanisms will collapse resulting in cellular damage and possibly death (Cañedo Argüelles et al., 2013).

High concentrations of Cl<sup>-</sup> (378.6 mg/l) in DP were recorded. These values exceeded the levels recommended by the US Environmental Protection Agency (230 mg/l) for the protection of aquatic life (USEPA, 1988). Prolonged exposure to Cl<sup>-</sup> concentrations above 220 mg/l is harmful to aquatic species causing developmental abnormalities such as decreased growth and failure or delays in the metamorphosis (Christy and Dickman, 2002; Sanzo and Hecnar, 2006; Kaushal et al., 2005; Collins and Russell, 2009).

#### 4.2. Blood biomarkers

The erythrocyte micronucleus test is used in several amphibian species to monitor aquatic pollutants displaying genotoxic potential (Peltzer et al., 2013; Babini et al., 2015; Pollo et al., 2015a). Consequently, the increase of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of individuals collected in more perturbed environment indicates that some pollutant, or a combination of them, are inducing genotoxic effects. The higher micronucleated erythrocyte frequency in tadpoles respect to adults may be related to the highest cell division rate and to the varying degree and time of exposure to water pollutants during this phase of life cycle (Barni et al., 2007).

Additionally, ENA assays in adults and tadpoles showed the existence of a significantly higher value of nuclear abnormalities in erythrocytes of *H. cordobae* from the mine pond compared to individuals inhabiting in natural streams. In general, ANE frequencies were consistently higher than the Mn frequencies. Since both blood markers have been interpreted as analogous nuclear lesions (Aylon and Garcia-Vazquez, 2000; Serrano García and Montero Montoya, 2001; Guilherme et al., 2008) this result suggest that ANEs could indicate a wider spectrum of DNA damage than the micronuclei formation (Gómez Meda et al., 2006). These results demonstrate that there would be a higher degree of genetic instability in *H. cordobae* individuals inhabiting in the decantation

ponds and that this environment would represent a hostile habitat for the species. However, to our knowledge, this is the first report on the incidence of genotoxic damage in *H. cordobae* and there is no previous data on the basal threshold of micronucleus and nuclear abnormalities of this species obtained in laboratory. In this case, the reference values were obtained from individuals of LH stream, which was the natural site farther from the mine.

One of the most important functions of erythrocytes is to carry oxygen and carbon dioxide. The presence of enucleated forms of circulating red cells in DP may represent a special device for increasing oxygen carrying efficiency, particularly in conditions of water contamination, by improving the cell surface/volume ratio (Barni et al., 2007). The high appearance of enucleated erythrocytes in tadpoles in comparison to adults may be attributed to the absolute dependence of this stage of aquatic environment. Although, the eccentric or peripheral splitting plane of bilobed cells can result to the formation of enucleus (Anbumani and Mohankumar, 2012), this cell type have also been reported in situations of diet change, diseases and metabolic stress (Fijan, 2002). Some of these conditions could explain their occurrence in adults.

The increase in immature erythrocyte frequency in tadpoles observed in DP and CN stream would reflect an increase in erythropoiesis (Peltzer et al., 2013), which could be a response to stress caused by high concentrations of ions (Valenzuela et al., 2006; Prieto et al., 2008). Furthermore, fluorine is considered an effective anabolic agent because it promotes cell proliferation (Barbier et al., 2010) affecting the oxygen availability in this site. Consequently, the presence of mitotic erythroid cells in polluted conditions indicates that erythropoiesis is directly stimulated in peripheral circulation of adults and could represent a short-term means for increasing the oxygen carrying capacity of blood in amphibian species (Barni et al., 2007).

#### 4.3. Body condition

Of the two variables used to calculate body condition, only the weight can both increase and decrease rapidly in response to a change in stress levels (Reading and Clarke, 1995). The loss of body condition in tadpoles from DP may result from food scarcity, because food availability may be directly affected by environmental conditions. Pollo et al. (2015b) analyzed the diet of *Rhinella arenarum* and *H. cordobae* tadpoles from this site, and reported that the quantity of food available for tadpoles was significantly lower compared to natural sites. This outcome could be related to water characteristics such as turbidity, depth and substrate type. Furthermore, strong variations in conductivity in short time periods and high concentrations of salinity could affect periphyton growth (Cañedo Argüelles et al., 2013).

Comparing the biometric measures, weight and size, adult individuals from DP were significantly larger and heavier and showed a higher body condition than individuals from streams. This increased value does not necessarily mean that individuals have better state of health (Polo Cavia et al., 2010). A habitat may induce phenotypic differences in natural populations, resulting in apparently healthy traits, as a larger body size that could not necessarily correlate with the true health condition of population. Consequently, individuals from DP may have a higher body condition because the environment presents a high availability of food resources and warmer temperatures that promote the digestion and increase the metabolic rate. Thus, the election of this site is explained by the ecological and reproductive features of this species, which prefers vegetated ponds as breeding sites, favoring the calling site availability. It is common to find this species basking on rocks or perched on vegetation (Barrio, 1962). These features could be associated with a higher water temperature and

an increase of food and shelter availability. However, this habitat with increased food availability could not be necessarily the more appropriate considering not only the mixture of compounds to which the individual are exposed but also other biological stressors as parasites, competitors and the human activity.

#### 4.4. Conclusion

In this work, an increased genotoxicity in DP was found in both adults and tadpoles, the last being the most affected. This could be explained by the high values of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{F}^-$ . Previous studies have shown that  $\text{Cl}^-$  and  $\text{Na}^+$  ions have an acute and chronic toxic effect on amphibians at environmentally realistic concentrations (Christy and Dickman, 2002; Sanzo and Hecnar, 2006) while fluorine ions act to cellular level as an inhibitor of enzymatic activities causing cell death by apoptosis (Camargo, 2003; Barbier et al., 2010). Therefore, it is difficult to establish a direct cause-effect relationship with a specific element, but, in such complex mixtures, synergistic and/or antagonistic interactions between substances could lead to biological effects that are not easily predictable (Gauthier et al., 2004).

Finally, biomarker responses indicate that individuals of *H. cordobae* are being affected by exposure to pollution in artificial decantation ponds. However, this environment appears to be preferred by this species compared to other surrounding natural environments. Chronic exposure to pollutants could derive in degenerative and neoplastic diseases in target organs (Barni et al., 2007). Although we did not detect an increased mortality in this site, individuals inhabiting in this environment may experience reproductive and behavioral alterations, which could lead to long-term population declines.

#### Acknowledgements

We thank the Secretary of Research and Technology of National University of Río Cuarto (PPI 18/C448) and National Agency for Scientific and Technological Promotion FONCYT (BID-PICT 0932-2012 and BID-PICT 2533-2014) for provided funds. The first, second and third authors thank CONICET – Argentina (Argentinean National Research Council for Science and Technology) for fellowships granted. The investigation was conducted according to the state law “Protection and Conservation of Wild Fauna” (Argentina National Law No 22.421). Our study was authorized by Cordoba Environmental Agency (A.C.A.S.E.), Environmental Secretary of Córdoba Government. The authors gratefully acknowledge the Fluorite Córdoba SA Company for allowing access to Los Cerros Negros mine and provided logistic support.

#### References

- Addy, K., Green, L., Herron, E., 2004. pH and Alkalinity. University of Rhode Island, Kingston.
- Anbumani, S., Mohankumar, M.N., 2012. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish *Catla catla*. *Aquat. Toxicol.* 122, 125–132.
- Antunes, S.C., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53 (2), 207–213.
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Nunes, B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2008. *In situ* bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 620–631.
- APHA-AWWA, 1999. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. Lenore, Clescerl, Greenberg y Eaton (eds.) American Public Health Assoc., American Water Works Assoc., Water Environment Federation, p. 1325.
- de Arcaute, C.R., Pérez-Iglesias, J.M., Nikoloff, N., Natale, G.S., Soloneski, S., Larraemendy, M.L., 2014. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on

- circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecol. Indic.* 45, 632–639.
- Aylon, F., Garcia-Vazquez, E., 2000. Induction of micronuclei and Other Nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: An assessment of the Fish micronucleus Test. *Mutat. Res-Gen. Toxicol. En.* 467 (2), 177–186.
- Babini, M.S., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L., 2015. Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 118–125.
- Babini, M.S., Bionda, C., Salas, N.E., Martino, A.L., 2016. Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*). *Environ. Monit. Assess.* 188 (8), 1–14.
- Barbier, O., Arreola-Mendoza, L., Del Razo, L.M., 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem.-Biol. Interact.* 188, 319–333.
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., 2007. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquat. Toxicol.* 81, 45–54.
- Barrio, A., 1962. Los Hylidae de Punta Lara, Provincia DE Buenos Aires. Observaciones sistemáticas, ecológicas y análisis espectrográfico Del Canto. *Physis* 23, 129–142.
- Bionda, C., Lajmanovich, R., Salas, N., Martino, A., di Tada, I., 2013. Population demography in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) and *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leiperidae) in agroecosystems in the province of Córdoba, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 61 (3), 1389–1400.
- Bionda, C.D.L., di Tada, I.E., Lajmanovich, R.C., 2011. Composition of amphibian assemblages in agroecosystems from the central region of Argentina. *Russ. J. Herpetol.* 18 (2), 93–98.
- ter Braak, C.J.K., Smilauer, P., 2002. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, New York, p. 500.
- Camargo, J.A., 2003. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere* 50, 251–264.
- Canadian Council of Ministers of Environment (CCME), 2002. Canadian Water Quality Guidelines for Protection of Aquatic Life: Inorganic Fluorides, pp. 1–4.
- Cañedo Argüelles, M., Kefford, B.J., Piscart, C., Prat, N., Schäfer, R.B., Schulz, C.J., 2013. Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. *Environ. Pollut.* 173, 157–167.
- Cantú, M.P., Degiovanni, S.B., 1984. Geomorfología de la región centro sur de la provincia de Córdoba. In IX Congreso Geológico Argentino, Asociación Geológica Argentina. *Actas* 4, 76–92.
- Cao, J., Chen, J., Wang, J., Wu, X., Li, Y., Xie, L., 2013. Tissue distributions of fluoride and its toxicity in the gills of a freshwater teleost, *Cyprinus carpio*. *Aquat. Toxicol.* 130, 68–76.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Mayers, M.S., 1990. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2123–2136.
- Castro, B.B., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2003. In situ bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut.* 125 (3), 325–335.
- Chai, L., Dong, S., Zhao, H., Deng, H., Wang, H., 2016. Effects of fluoride on development and growth of *Rana chensinensis* embryos and larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 126, 129–137.
- Christy, M.T., Dickman, C.R., 2002. Effects of salinity on tadpoles of the green and golden bell frog (*Litoria aurea*). *Amphib.-Reptil.* 23 (1), 1–11.
- Chuah, C.J., Lye, H.R., Ziegler, A.D., Wood, S.H., Kongpun, C., Rajchagool, S., 2016. Fluoride: a naturally-occurring health hazard in drinking-water resources of Northern Thailand. *Sci. Total Environ.* 545, 266–279.
- Collins, S.J., Russell, R.W., 2009. Toxicity of road salt to Nova Scotia amphibians. *Environ. Pollut.* 157 (1), 320–324.
- Coniglio, J., 2006. Evolución petrológica y metalogenética del batolito Cerro Áspero en relación con el ciclo geoquímico endógeno del Flúor, Sierras de Comanchingones, Córdoba, Argentina. Tesis Dr. UNRC, 163.
- Coniglio, J., D'Eramo, F., Pinotti, L., Demartis, M., Petrelli, H., 2006. Magmatismo devónico DE Las Sierras DE Córdoba: Fuente posible DE flúor DE Las mineralizaciones mesozoicas EL ejemplo Del batolito Cerro áspero. VIII Congreso DE Mineralogía y Metalogenia. *Actas* 1, 227–232.
- Dacie, J.V., Lewis, S.M., 1984. Practical Hematology. Churchill Livingstone, New York.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2012. Grupo InfoStat Professional, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81–95.
- Fijan, N., 2002. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *J. Fish. Biol.* 60 (4), 999–1014.
- Flickinger, E.L., Nichols, J.D., 1990. Small mammal populations at hazardous waste disposal sites near Houston, Texas, USA. *Environ. Pollut.* 65, 169–180.
- García, G., Fontúrbel, 2003. Propuestas Para UN Desarrollo sostenible. Lago Titikaka por estrategias K. Ed. Publicaciones Integrales. LA Paz.
- Gauthier, L., Tardy, E., Mouchet, F., Marty, J., 2004. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Sci. Total Environ.* 323 (1), 47–61.
- Goh, E.H., Neff, A.W., 2003. Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. *Food Chem. Toxicol.* 41 (11), 1501–1508.
- Gómez Meda, B.C., Zamora Pérez, A.L., Luna Aguirre, J., González Rodríguez, A., Ramos Ibarra, M.L., Torres Bugarín, O., Batista González, C.M., Zúñiga González, G.M., 2006. Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. *Avian Pathol.* 35 (3), 206–210.
- Gosner, K., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16, 183–190.
- Guilherme, S., Válega, M., Pereira, M.E., Santos, M.A., Pacheco, M., 2008. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70 (3), 411–421.
- Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.C., Foster, M.S., 1994. Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods For Amphibians. (eds.) Washington, Smithsonian Institution Press, p. 364.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, Jr. G.A., Cairns, Jr. J., (Eds.) 2010. Handbook of Ecotoxicology CRC press.
- Jakob, E.M., Marshall, S.D., Uetz, G.W., 1996. Estimating fitness: a comparison of body condition indices. *Oikos* 77, 61–67.
- Kaushal, S.S., Groffman, P.M., Likens, G.E., Belt, K.L., Stack, W.P., Kelly, V.R., Band, L.E., Fisher, G.T., 2005. Increased salinization of fresh water in the northeastern United States. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 13517–13520.
- Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Attademo, A.M., Sanchez, L.C., Bassó, A., 2010. Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River floodplain: implication for ecological risk assessment of soybean crops. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (7), 1517–1524.
- Lajmanovich, R.C., Cabagna Zenklusen, M.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Bassó, A., Lorenzatti, E., 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty<sup>®</sup> and glufosinate-ammonium. *Toxicol. Environ. Mutagen.* 769, 7–12.
- Lavoie, I., Lavoie, M., Fortin, C., 2012. A mine of information: benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings. *Sci. Total Environ.* 425, 231–241.
- Law 24051, 1992. Ley Nacional de Residuos Peligrosos (Regime for hazardous wastes). Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Argentina. On line (<http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/residuos/ley24051.htm>). Access 20 nov 2015.
- Lihong, C., Xiaoli, L., Ling, J., Suiming, D., Hongyuan, W., 2011. Acute toxicity and DNA Damage of Fluoride to larval Big Toad *Bufo gargarizans*. In Water Resource and Environmental Protection, International Symposium on 430–433.
- Machado da Rocha, C., 2011. The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tool for xenobiotic exposure risk assessment: a brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to copper sulphate. *Middle-East J. Sci. Res.* 8 (1), 23–29.
- Marques, S.M., Gonçalves, F., Pereira, R., 2008. Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi* Seoane. *Sci. Total Environ.* 402, 29–35.
- Marques, S.M., Chaves, S., Gonçalves, F., Pereira, R., 2013. Evaluation of growth, biochemical and bioaccumulation parameters in *Pelophylax perezi* tadpoles, following an in-situ acute exposure to three different effluent ponds from a uranium mine. *Sci. Total Environ.* 445, 321–328.
- Martino, A.L., Sinsch, U., 2002. Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *J. Zool.* 257, 67–81.
- Nöller, H.G., 1959. Eine einfache technik der blutentnahme beim frosch. *Pflüg. Arch. Physiol.* 269, 98–100.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Cabagna-Zenklusen, M.C., Repetti, M.R., Sigrisc Beldoménico, H., 2013. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 142–151.
- Pollo, F.E., Salas, N.E., Mancini, M.A., Martino, A.L., 2012. Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de tres especies icticas. *Acta Toxicol. Arg.* 20 (2), 62–67.
- Pollo, F.E., Bionda, C.L., Salinas, Z.A., Salas, N.E., Martino, A.L., 2015a. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environ. Monit. Assess.* 187, 1–9.
- Pollo, F.E., Cibils, L., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L., 2015b. Trophic ecology of syntopic anuran larvae, *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) and *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae): Its Relation to the Structure of Periphyton. *Ann. Limnol.-Int. J. Limnol.* 51 (3), 211–217.
- Polo Cavia, N., Engstrom, T., López, P., Martín, J., 2010. Body condition does not predict immunocompetence of western pond turtles in altered versus natural habitats. *Anim. Conserv.* 13 (3), 256–264.
- Prieto, Z., Incio, J.L., Quijano Jara, C., Fernández, R., Polo Benites, E., Vallejo Rodríguez, R., Villegas Sánchez, L., 2008. Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (Tilapia). *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* 25, 51–58.
- Reading, C.J., Clarke, R.T., 1995. The effects of density, rainfall and environmental temperature on body condition and fecundity in the common toad, *Bufo bufo*. *Oecologia* 102 (4), 453–459.
- Rowe, C.L., Sadinski, W.J., Dunson, W.A., 1992. Effects of acute and chronic acidification on three larval amphibians that breed in temporary ponds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23 (3), 339–350.
- Sanzo, D., Hecnar, S.J., 2006. Effects of road de-icing salt (NaCl) on larval wood frogs (*Rana sylvatica*). *Environ. Pollut.* 140 (2), 247–256.
- Serrano García, L., Montero Montoya, R., 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ. Mol. Mutagen.* 38, 38–45.
- da Silva Souza, T., Fontanetti, C., 2006. Micronucleus Test and Observation of Nuclear alteration in Erythrocytes of Nile Tilapia exposed to Waters Affected by Refinery effluent. *Mutat. Res-Gen. Toxicol. En.* 605 (1), 87–93.

- US Environmental Protection Agency, 1988. Ambient Water Quality Criteria for Chloride. EPA PB88-175-047. USEPA, Washington, DC.
- Valenzuela, A.E., Silva, V.M., Klempau, A.E., 2006. Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture* 251, 596–602.
- Vera Candiotti, J.V., Natale, G.S., Soloneski, S., Ronco, A.E., Larramendy, M.L., 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida<sup>®</sup>. *Chemosphere* 78 (3), 249–255.
- Wood, S.L., Richardson, J.S., 2009. Impact of sediment and nutrient inputs on growth and survival of tadpoles of the Western Toad. *Freshw. Biol.* 54 (5), 1120–1134.

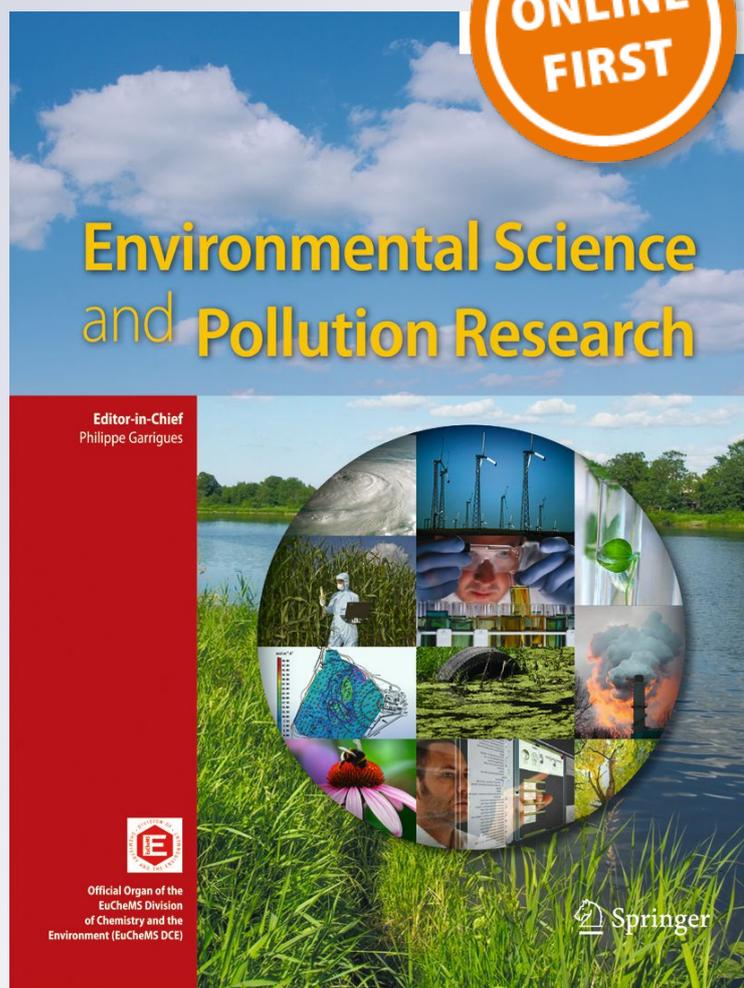
*Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad Rhinella arenarum in environments related to fluorite mine*

**Favio E. Pollo, Pablo R. Grenat, Zulma A. Salinas, Manuel A. Otero, Nancy E. Salas & Adolfo L. Martino**

**Environmental Science and Pollution Research**

ISSN 0944-1344

Environ Sci Pollut Res  
DOI 10.1007/s11356-017-9479-2



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

# Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine

Favio E. Pollo<sup>1,2</sup> · Pablo R. Grenat<sup>1,2</sup> · Zulma A. Salinas<sup>1,2</sup> · Manuel A. Otero<sup>1,2</sup> · Nancy E. Salas<sup>1</sup> · Adolfo L. Martino<sup>1</sup>

Received: 25 October 2016 / Accepted: 7 June 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

**Abstract** Little attention has been paid to the impact of wastewater generated by mining activities on fluoride. In this study, we evaluated the hematology responses of common South American toad *Rhinella arenarum* inhabiting natural and artificial environments associated with a fluorite mine from central Argentina. We analyzed three sampling stations associated with the fluorite mine: (I) Los Cerros Negros stream (CN), which runs on granitic rock with a high fluorite content; (II) Los Vallecitos stream (LV), which runs on metamorphic rock with low fluorite content; and (III) artificial decantation ponds (DP) containing sediments produced by fluorite flotation process. We calculated frequencies of micronuclei, erythrocyte nuclear abnormalities, mitosis, and immature erythrocytes. In addition, we performed a differential leukocyte count and determined neutrophils/lymphocyte ratio as a stress response estimator. We found high micronucleus (MN) and erythrocyte nuclear abnormality (ENA) frequencies in DP and CN but low frequencies in LV. The neutrophil/lymphocyte ratio was different among sites, with a significant increase in individuals from DP. Values registered in DP could be caused by exposure to mixture of compounds registered in dams that hold wastewater, while high values registered in CN stream might be due to natural concentrations of fluoride. Our results suggest that blood is an effective and

non-destructive sensitive indicator for monitoring genotoxic agents in freshwater ecosystems.

**Keywords** Fluorite mine · Micronuclei · Nuclear abnormalities · Leukocyte · *Rhinella arenarum*

## Introduction

Wastewater generated by mining activities contains complex mixtures of assorted contaminants (Marques et al. 2009; Zocche et al. 2013; Lanctôt et al. 2016), raising concerns about possible threats to aquatic biota. Aquatic animals as amphibians could choose to exploit wetland habitats created by wastewater holding dams, presenting an additional possible exposure scenario (Lanctôt et al. 2016). Particularly, amphibians are sensitive to environmental changes because they have a highly permeable skin, which can easily absorb substances from the environment, and have a life cycle with aquatic and terrestrial stages (Young et al. 2004). These organisms have been used for biomonitoring studies because they respond rapidly to ecosystem changes. This vulnerability has also been responsible for decline in amphibian populations worldwide (Stuart et al. 2004).

Laboratory toxicity testing does not always generate ecologically relevant information because field situations may not be accurately simulated under laboratory conditions, and sample collection, storage, or handling can affect toxicity (Castro et al. 2003). In situ bioassays are an effective tool to overcome this problem, providing a more realistic approach, because these studies contemplate environmental phenomena such as bioavailability of compounds present in the environment and allow the interaction of multiple factors that are not often included in laboratory tests (Djomo et al. 2000; Castro et al. 2003; Antunes et al. 2008; Lavoie et al. 2012). Among the

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Favio E. Pollo  
faviopollo@gmail.com

<sup>1</sup> Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC, Ruta 36km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

techniques for the detection of genotoxic effects, micronucleus (MN) test and erythrocyte nuclear abnormalities (ENA) are the most popular in ecotoxicology (Ayllon and Garcia Vazquez 2000; da Silva Souza and Fontanetti 2006; Machado da Rocha 2011) because of their simplicity, sensitivity, and sublethal detection of alterations which lead to early prevention and/or remediation (Livingstone 1993).

Based on our review of literature, the only study exploring in situ the genotoxicity in aquatic animals inhabiting wetland related to fluorite mining has been carried by Pollo et al. (2016), although in this work they were not measured stress indicators. Therefore, the present study evaluates the hematology responses of common South American toad *Rhinella arenarum* inhabiting natural and artificial environments associated with a fluorite mine from central Argentina. This species provides a suitable and useful experimental model for monitoring aquatic ecosystems (Vera Candiotti et al. 2010, Pollo et al. 2015), and its sensitivity to pollutants was proven in several studies (Howe et al. 1998; Venturino et al. 2003; Bosch et al. 2011; Lajmanovich et al. 2014, Pollo et al. 2015). The study area can be regarded as a “field laboratory” offering an opportunity for the assessment of toxicity under realistic conditions, because of absence of other important sources of contaminants (e.g., agrochemicals, sewage, livestock breeding).

## Materials and methods

### Study area and site selection criteria

The study area is located in a large granitic batholith, Cerro Áspero (32° 50' 22.85" S; 64° 79'40.60" W; altitude 1200 m.a.s.l) in the center-south region of Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina (Fig. 1). In this area, the main deposits of ephithermal fluorite of Sierras Pampeanas are located (Coniglio 2006). The Sierras Pampeanas are constituted mostly by metamorphic plutonic basement, composed mainly of coarse-grained metamorphic rocks (gneisses and migmatites), and intruded into the Lower Paleozoic by granitic batholiths (Cantú and Degiovanni 1984). These batholiths have an average content of F<sup>-</sup> of 1.210 mg/kg, which is two times higher than the host metamorphic rocks and other non-mineralized granites of the Sierras de Córdoba (Coniglio et al. 2006). This natural formation allowed the installation of mines in the area, being the Los Cerros Negros mine the only active in Córdoba since 1991.

The mining establishment is located in a natural matrix in which the remoteness of urban settlements and the characteristics of the mountainous landscape make those potential sources of contamination related to the development of agricultural and livestock activities or sewage absent in the area. The effluents derived from the mineral treatment end in a

series of artificial ponds (earth dams) of approximately 15 m by 25 m, elevated about 3 m above the land, vegetated with *Typha* sp. In these artificial ponds, sediments produced by fluorite flotation process are precipitated. These decantation ponds are a closed system, and the effluents never come into contact with nearby natural streams. Associated with this area, the basin of Los Cerros Negros stream, with an area of 10 km<sup>2</sup>, circulates on granitic rock from west to east. Near the fluorite mine, it receives the Los Vallecitos stream which is born and runs through metamorphic rock and finally flows into the Guacha Corral River, the most important water course in this area.

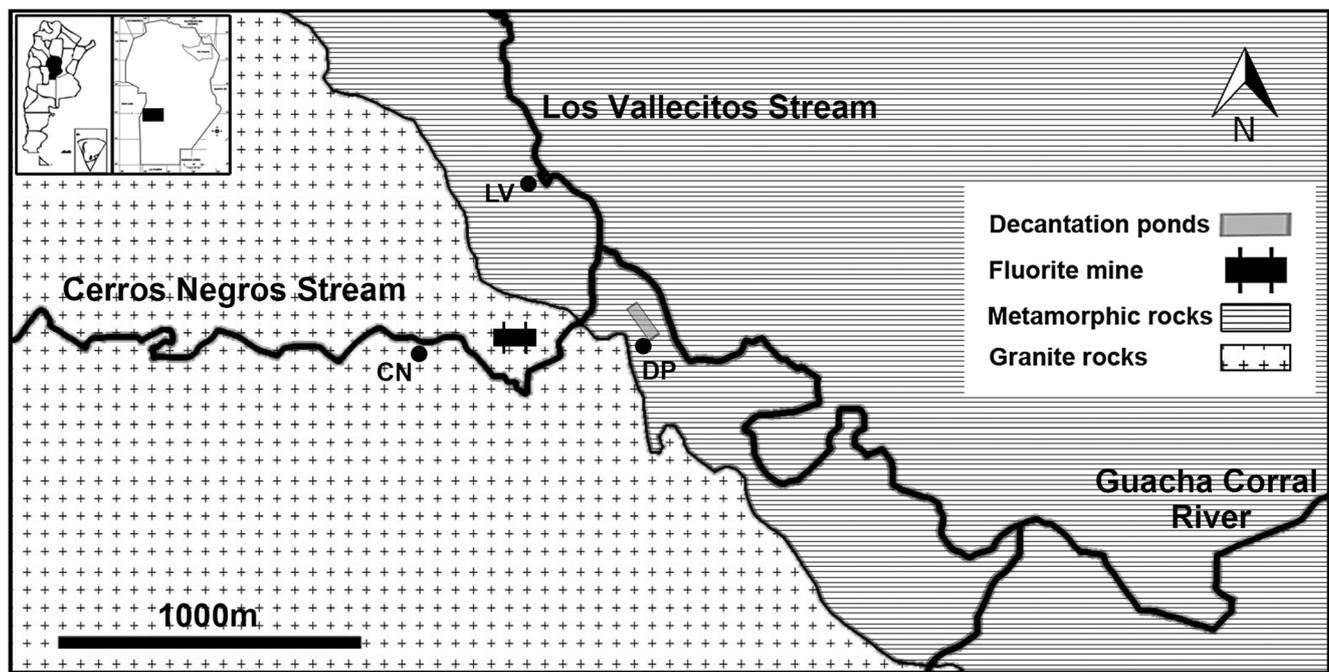
The physicochemical characterization of surface water made in this area indicates that fluoride ion is found in concentrations less than 0.35 mg/l for streams belonging to metamorphic environments, while streams circulating in granitic environments have an average concentration of 0.90 mg/l (Coniglio 2006).

Considering the data presented above, three sampling stations were selected: (I) Los Cerros Negros stream (CN), which runs on granitic rock with a high fluorite content; (II) Los Vallecitos stream (LV), which runs on metamorphic rock with low fluorite content; and (III) artificial decantation ponds (DP) containing sediments produced by fluorite flotation process. In all sites, the presence of populations of *R. arenarum* was previously detected (Fig. 1).

### Sampling methods and data collection

We sampled all three sites from September 2013 to March 2014, the period of increased reproductive activity for *R. arenarum* and therefore when the individuals are found near of water bodies (Bionda et al. 2011). These months coincide with the period of rainfall and warmer temperatures. In each site, 20 adult individuals were found by visual encounter surveys (Heyer et al. 1994) and captured by hand. To each individual, we recorded snout–vent length (SVL) using a digital caliper Mahr 16 (0.01 mm) and sex according to external secondary sexual characteristics such as the presence of vocal sac and nuptial pads (Duellman and Trueb 1994).

At each sampling site, water samples for chemical analyses were collected. Superficial water (0.25 m depth) samples were collected in 1-L plastic bottles, which were filled to the brim and tightly capped to exclude oxygen preventing oxidations. We also had special care taken to avoid the possible resuspension of sediments. Samples were analyzed for Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, F<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, and hardness (based on calcium and magnesium total content) by the area of Hydrology, Department of Geology, National University of Río Cuarto, using standard methods (APHA-AWWA 1999). Furthermore, water temperature, pH, electrical conductivity, total dissolved solids (TDS), and salinity were measured in situ, using a digital equipment 35-Series 35425-10 tests (Oakton Instruments



**Fig. 1** Location of sampling sites in granitic batholith, Cerro Áspero in the center-south region of Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina. *Black point* indicates the sampling sites

625E Bunker Court Vernon Hills, IL 60061, USA). Dissolved oxygen was measured using a meter HD3030.

### Blood cell morphology

Blood samples were obtained from angularis vein of each individual (Nöller 1959; Martino and Sinsch 2002) without sacrificing specimens. Then, all individuals were released at their point of capture. Two peripheral blood smears by each individual were prepared on clean slides, fixed, and stained using May Grunwald-Giemsa (Dacie and Lewis 1984). Two thousand erythrocytes per individual were examined at  $\times 1000$  magnification (Zeiss™ Primo Star iLED).

The criteria for distinguishing a MN were as follows: (a) the intensity of a stained MN was similar to that of the principal nucleus but with an inferior diameter, (b) it was round with a nuclear membrane and not connected to the principal nucleus, and (c) did not overlap with the principal nucleus and located within the cytoplasm (Schmid 1975; Fenech 2000). Four ENA were classified according to Carrasco et al. (1990) as blebbed (nuclei presenting a relatively small evagination from the envelope, which seems to contain euchromatin); lobed (nuclei with evaginations larger than those from blebbed nuclei), notched (nuclei that presented a remarkable notch containing nuclear material), and binucleated. The results were expressed as ENA mean frequency (%) of the sum of all abnormalities observed (Lajmanovich et al. 2014). Furthermore, the mitotic index (MI) was calculated (mitotic cells per 1000 cells).

Immature erythrocyte frequency (IE) was estimated in order to assess alterations on hematological dynamics. The distinction between mature (ME) and immature erythrocytes (IE) was made following Guilherme et al. (2008): IE has a bluish-gray cytoplasm and the nucleus is rounder and larger than ME.

In addition, we performed a differential leukocyte count (neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, and monocytes) according to the methodology of Davis (2009). The neutrophils/lymphocyte ratio ( $N/L$ ) was calculated as a stress response estimator (Davis et al. 2008).

### Statistical analysis

Data distributions for normality (Shapiro-Wilks test) and homogeneity of variances (Levene test) were assessed. A comparative analysis of the environmental variables was performed. Water temperature and pH were compared using one-way ANOVAs followed by the DCG post hoc test (Test Di Rienzo, Guzmán, and Casanoves). Conductivity, salinity, and total dissolved solids were compared between sites using a non-parametric Kruskal-Wallis test, because these variables did not meet the assumptions of the ANOVA.

Significant differences between sites for SVL, MN, ENA, and MI were analyzed using  $t$  test. Non-parametric Kruskal-Wallis test was used to assess differences between sites in leukocyte. All analyses were conducted using InfoStat (Di Rienzo et al. 2012). Statistical significance was considered to be reached at  $P$  value  $< 0.05$ .

## Results

Physicochemical parameters and ion concentrations in water of each sampling site are shown in Table 1. Within each site, there was no significant difference when comparing the SVL between sites (Table 2). However, significant differences in SVL between LV and CN individuals were found ( $p < 0.05$ ), but no differences were recorded between both LV and DP ( $p = 0.07$ ) and between CN and DP ( $p = 0.95$ ) individuals (Table 2) when we do not consider sex.

Sex influence on MN, ENA, and IE frequencies, using SVL as covariable, was evaluated but it was not statistically significant (LV: MN  $p = 0.34$ , ENA  $p = 0.12$ , IE  $p = 0.35$ ; CN: MN  $p = 0.10$ , ENA  $p = 0.66$ , IE  $p = 0.28$ ; DP: MN,  $p = 0.76$ , ENA  $p = 0.51$ , IE  $p = 0.92$ ). Consequently, for subsequent analyses, we combined males and females in a single sample per site.

Analyses of MN frequency and ENAs, considering the total number of nuclear abnormalities (Table 3A), revealed significant differences between sites, except ENAs between CN and DP ( $p = 0.15$ ). LV toads showed the lowest MN and ENA frequencies, while DP was the site with highest frequencies. For immature erythrocytes, no differences were recorded between sites (Table 3A). The dividing erythrocytes, more frequent in toads from DP, appeared mainly as mitotic figures (Fig. 2).

The results of differential leukocyte blood counts are shown in Table 3B. Kruskal-Wallis test showed a significant difference in neutrophils (Fig. 2) and  $N/L$  ratio between sites ( $p < 0.05$ ).

## Discussion

### Physicochemical characterization of sites and its influence on organisms

Mining activity is a source of physical, chemical, biological, and landscape alterations. Evaluation of environment quality, particularly in aquatic ecosystems, has traditionally been based on physicochemical measurements of water but not necessarily provides adequate information on exposure and response of living organisms to pollution (Antunes et al. 2008; Lavoie et al. 2012), although they are a complementary tool.

Toxicity levels of many pollutants depend primarily on pH, in addition to the temperature (Cairns et al. 1975; Boyd 1982; Hoffman et al. 2010). Aquatic organisms require a pH range between 6.5 and 8 for optimal growth and survival. Outside this range, organisms become physiologically stressed (Addy et al. 2004). In amphibians, pH values for

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

	Sites		
	LV	CN	DP
Water temperature (T°W)	19.17 ± 2.73	20.01 ± 2.60	23.20 ± 4.15*
pH	8.30 ± 0.24	7.70 ± 0.34	8.50 ± 0.32*
SDT (ppm)	78.57 ± 16.16	35.51 ± 17.43	251.19 ± 374.78*
Salinity (S) ppm	54.75 ± 10.61	26.46 ± 8.92	476.23 ± 382.01*
Conductivity (Cond) μS/cm	112.50 ± 24.50	49.04 ± 23.48	1495.81 ± 643.99*
Dissolved oxygen (O <sub>2</sub> ) %	92.30 ± 17.18	94.90 ± 12.16	69.93 ± 9.07
Hardness CO <sub>3</sub> Ca (ppm)	54.00 ± 5.66	20.00 ± 5.70	74.00 ± 8.50
CO <sub>3</sub> mg/l	1.80 ± 2.55	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
HCO <sub>3</sub> mg/l	70.65 ± 7.99	22.50 ± 7.10	375.00 ± 240.40
Sulfates (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ) mg/l	25.00 ± 0.28	8.25 ± 1.60	102.05 ± 30.20
Chloride (Cl <sup>-</sup> ) mg/l	3.60 ± 0.99	2.9 ± 0.00	378.6 ± 232.40
Sodium (Na <sup>+</sup> ) mg/l	7.30 ± 0.99	5.65 ± 1.50	422.65 ± 277.40
Potassium (K <sup>+</sup> ) mg/l	0.85 ± 0.21	0.30 ± 0.00	9.60 ± 2.10
Calcium (Ca <sup>++</sup> ) mg/l	15.6 ± 5.09	4.40 ± 0.60	18.40 ± 1.10
Magnesium (Mg <sup>++</sup> ) mg/l	3.65 ± 1.77	2.20 ± 1.00	6.85 ± 2.80
Fluoride (F <sup>-</sup> ) mg/l	0.25 ± 0.07	1.90 ± 1.00	14.20 ± 3.70
Nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) mg/l	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Nitrite (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) mg/l	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Mean ± standard deviation

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

\* $p < 0.05$

**Table 2** Snout–vent length of males and females of *Rhinella arenarum* for each sampling site

Sites	n	SVL (mm)
LV	6 ♂	96.47 ± 12.72
	14 ♀	90.75 ± 16.75
CN	12 ♂	87.85 ± 8.29
	8 ♀	95.66 ± 7.56
DP	19 ♂	91.42 ± 11.36
	1 ♀	96.20 ± 0.00

Mean ± standard deviation

LV Los Vallecitos stream, CN Los Cerros Negros stream, DP decantation ponds, ♂ = male; ♀ = female

normal development are between 6.3 and 7.7 (García and Fontúrbel 2003). In our study, pH differed among sites with DP showing the most basic values, well above of optimal limits to aquatic organisms.

High concentration of  $SO_4^{2-}$  found in DP could be a direct outcome of the mining activity (Cañedo Argüelles et al. 2013). During the process, sludge coming out of the plant of flotation is treated with flocculants and sulfates to clarify the water (Martinez J.M., personal communication).

High salinity values recorded in the decantation ponds are mostly the result of the following major ions:  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ , and  $HCO_3^-$  (Cañedo Argüelles et al. 2013). A high salinity directly influences freshwater organisms because they need to maintain an

internal osmotic pressure relative to the medium in which they live. Therefore, when the salt concentration of the medium becomes too high, the osmoregulatory mechanisms could collapse resulting in cellular damage and possibly death (Cañedo Argüelles et al. 2013).

Water quality of sampling sites was evaluated by comparing the results of chemical parameters with globally suggested values for the protection of aquatic biota (Camargo 2003; Canadian Council of Ministers of Environment 2002) and maximum recommended values for human consumption available in the Argentine Food Code of 2012.  $F^-$  content at all sites were above the limit suggested (0.12 mg/l) by the Canadian Council of Ministers of Environment (2002). CN stream and DP showed higher concentrations than the value proposed (0.5 mg/l) by Camargo (2003) for protection of aquatic biota in freshwater ecosystems and boundary suggested (1.4 mg/l) by the Argentinian government (Law 24051 1992). Some authors report that fluoride ions act at cellular level as an inhibitor of enzyme activities and causing cell death by apoptosis (Camargo 2003; Barbier et al. 2010), but genotoxic effects are poorly known.

On the other hand, high concentrations of  $Cl^-$  and  $Na^+$  in decantation ponds were registered. Exposure prolonged to values above of the proposed limit for protection of aquatic biota could cause developmental abnormalities such as decreased growth and failure or delays in the metamorphosis of amphibians (Sanzo and Hecnar 2006; Collins and Russell 2009; Karraker and Ruthig 2009).

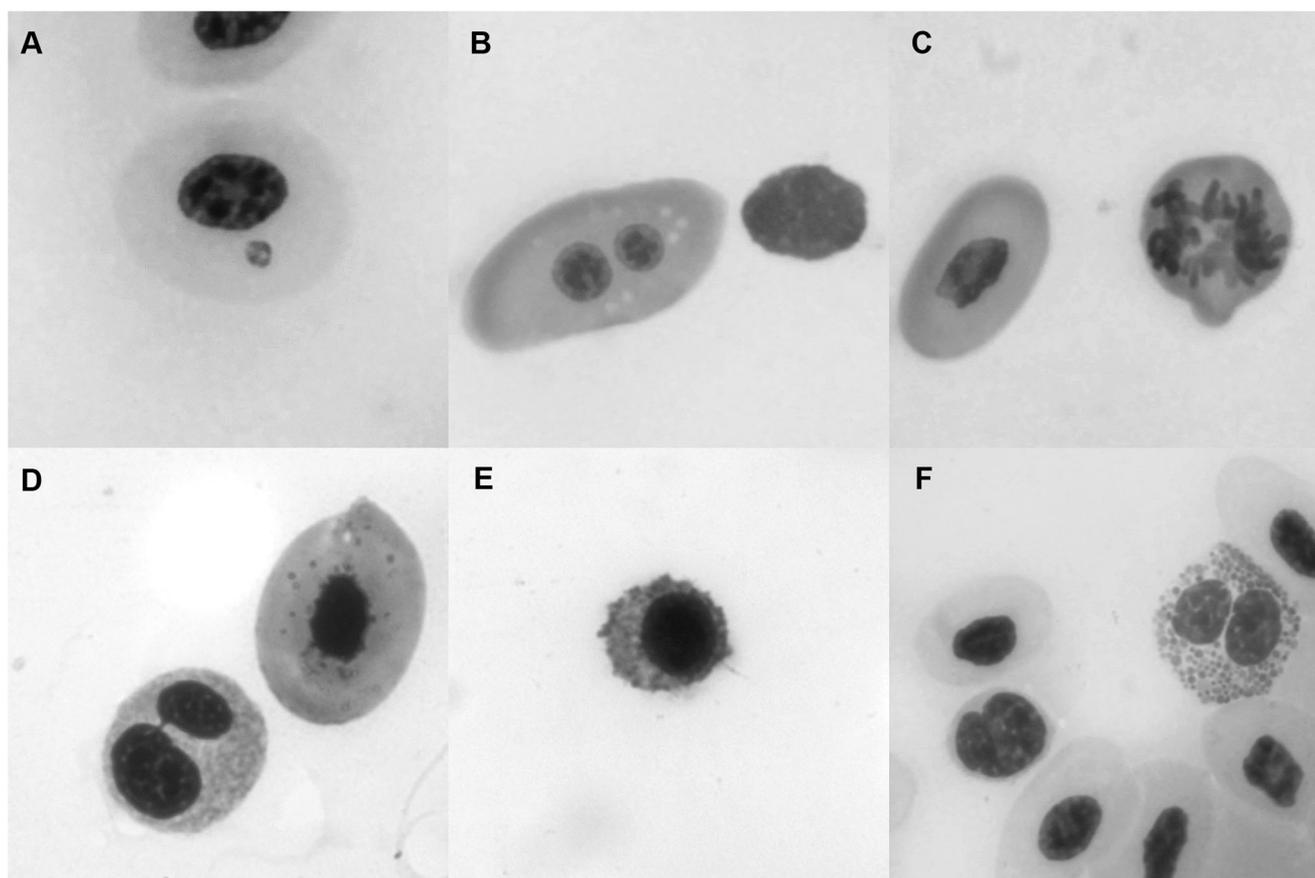
**Table 3** Mean values and standard deviations of cytogenotoxicity parameter and leukocyte count of *Rhinella arenarum* individuals

	Sampling sites		
	LV	CN	DP
Cytogenotoxicity parameter			
Micronuclei (MN)	0.03 ± 0.11	0.13 ± 0.29	0.30 ± 0.48 *
Erythrocyte nuclear abnormalities (ENA)	4.79 ± 3.19	8.79 ± 5.80	11.73 ± 7.15**
Mitotic index (MI)	0.19 ± 0.82	0.11 ± 0.29	0.18 ± 0.40
Immature erythrocytes (IE)	3.85 ± 4.33	8.80 ± 15.98	6.25 ± 8.98
Leukocyte count			
Neutrophils	10.44 ± 7.13	8.60 ± 6.52	33.20 ± 26.80**
Eosinophils	4.00 ± 4.66	3.90 ± 3.60	6.60 ± 5.80
Basophils	3.89 ± 2.26	4.50 ± 3.06	8.70 ± 8.26
Lymphocytes			
Immature	17.22 ± 15.16	16.50 ± 15.26	8.20 ± 6.23
Mature	74.00 ± 25.86	69.40 ± 22.71	55.20 ± 25.60
Monocytes	1.44 ± 1.51	2.10 ± 2.60	1.30 ± 1.57
N/L	0.11 ± 0.06	0.11 ± 0.10	0.97 ± 1.38**

Mean ± standard deviation

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

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$



**Fig. 2** Erythrocytes and leukocytes in peripheral blood of *R. arenarum*. **a** Micronuclei. **b** Binucleated cell. **c** Mitotic erythrocyte (*right side*). **d** Binucleated neutrophil with cytoplasmatic bridge. **e** Basophils. **f** Monocyte (*left side*) and eosinophils (*right side*)

### Cytogenotoxicity and stress

Micronucleus test in erythrocytes is widely used and recommended for studies to cell level on chronic exposure to different types of environmental pollutants with clastogenic and aneugenic properties (Udroiu 2006). According to Serrano García and Montero Montoya (2001), the nuclear abnormalities have a similar origin as micronuclei. For this reason in the last years, they have become very important as potential biomarkers.

In this study, toads from artificial DP and CN stream showed higher frequencies of micronuclei and nuclear abnormalities in comparison to organisms from LV stream. These results suggest genotoxic effects on erythrocytes of *R. arenarum* individuals, most probably caused by chronic exposure to factory effluents (DP) or to natural concentration of fluoride in the stream (CN). These results are in accordance with the studies by Pollo et al. (2016) who observed an increase in the frequency of MN in the ENAs in adults and larvae of *Hypsiboas cordobae*. The presence of micronuclei in a cell reflects structural or numerical chromosomal aberrations arising during mitosis (Fenech et al. 2011). Although there are studies that report variations in the morphology of

blood cell in humans (Tolbert et al. 1992; Serrano García and Montero Montoya 2001), mechanisms responsible for ENAs of fishes (da Silva Souza and Fontanetti 2006; Ergene et al. 2007; Pollo et al. 2012) and amphibians (Marques et al. 2009; Lajmanovich et al. 2014; Babini et al. 2015; Pollo et al. 2015) have not been fully understood. Some authors suggested that their high frequencies of apparition may be due to that many xenobiotics may interfere in the DNA synthesis or produce gene mutations in the structural constituents of nuclear envelope of exposed organisms which may result in nuclear anomalies (Beutler 1985; Strunjak Perovic et al. 2009). Other research (Shimizu et al. 1998; Crott et al. 2001) suggested that nuclear budding in interphase (which corresponds to blebbed and lobed nuclei) could be a precursor of micronuclei and represents a process for eliminating amplified genes from the nuclei.

On the other hand, we observed an increase of immature erythrocytes (IE) in toads from DP. It is known that the increase of IE could be a response to stress by pollutant presence (Valenzuela et al. 2006; Prieto et al. 2008). Considering other potential contaminant sources such as agrochemicals, sewage, and livestock breeding are absent in this site, the effluent from the mine could be directly related with this result.

Consequently, the presence of mitotic erythroid cells in polluted conditions indicates that erythropoiesis is directly stimulated in peripheral circulation of adults, which could represent a short-term way for increasing the oxygen carrying capacity of the blood in amphibians (Barni et al. 2007). Additionally, Seriani et al. (2015) found significant increase in the number of erythroblasts, possibly reflecting the release of immature blood cells in response to low concentrations of dissolved oxygen in water.

In addition to effects on erythrocytes, *R. arenarum* individuals from DP showed increased values of eosinophils and *N/L* ratio in relation to the other sites. Recent studies performed on amphibians and fishes showed that eosinophil increase may be associated with inflammatory processes and/or antitoxic responses due to either parasite infestation or chemical compounds present in effluents (Romanova and Egorikhina 2006; Barni et al. 2007; Attademo et al. 2013; da Silva Corrêa et al. 2016). In addition, the stress affects the number of neutrophils and lymphocytes in opposite directions and their relationship has been considered as a measure of stress response (Davis et al. 2008; Attademo et al. 2011).

Fluoride toxicity increases with increasing fluoride concentration, exposure time, and water temperature and decreases as water content of calcium and chloride increases and when water hardness is relatively soft (Camargo 2003). In this work, we find that high environmental fluoride correlates with certain responses measured in toads. In decantation ponds, the water had the highest fluoride concentration and mean temperatures and the most basic pH. This could be because it is an artificial environment receiving effluent from an industrial flotation process. During this process, the water is heated to 28 °C, and its pH is modified using calcium carbonate. After the sediment is decanted, the water returns to the factory to restart the process, without making contact with natural water courses. On the other hand, according to Gonzalo and Camargo (2012), the body size of organisms in aquatic medium with high fluoride concentrations has been reported as a factor affecting fluoride bioaccumulation and toxicity, with larger individuals exhibiting a higher tolerance than smaller ones.

## Conclusion

Physical–chemical analyses indicated a poor water quality of decantation ponds, as the results revealed ion concentrations which exceed legal standards. Decantation ponds showed higher conductivity, salinity, dissolved solids, and sulfate levels. However, we find toads inhabiting wastewater decantation ponds. Therefore, effluent studies offer a much closer representation of natural exposure scenarios than studies investigating single contaminants (Eggen et al. 2004). In these complex mixtures, the interpretation can be extremely

challenging as a result of the multitude of possible synergistic and/or antagonistic interactions between substances, resulting in biological effects that are not easily predictable (Eggen et al. 2004; Gauthier et al. 2004). The mechanisms of chemical synergy for mixtures are not fully understood. Some theories include an increase in the rate of uptake, formation of toxic metabolites, reduction of excretion, alteration of distribution, and inhibition of detoxification systems, which appears to be the most popular theory (Howe et al. 1998). Probably, the choice of this site by the *R. arenarum* individuals is because of the reproductive strategies of this species, which prefers hallow vegetated ponds, with direct sunlight incidence, as oviposition sites, (Sanabria et al. 2007; Bionda et al. 2011). These features could be associated with a higher water temperature and an increase of food and refuge availability.

Finally, this study helps to address an important gap in the literature by expanding on the limited number of in situ studies and exploring impacts of fluoride-mining on amphibians. Nevertheless, more researches are needed to explore the significance of observed effects on amphibian survival and development inhabiting environments impacted by fluoride-mining activities and to continue characterizing responses across a range of sites with different physicochemical components.

Future studies considering other molecular biological tools will be used to distinguish different potential toxicological mechanisms taking into account that fluorine affects different tissues such as the liver, kidney, brain, lung, and testes in animals living in areas of endemic fluorosis (Barbier et al. 2010).

**Acknowledgements** The authors gratefully acknowledge the Fluoride Córdoba SA Company for allowing access to Los Cerros Negros mine and providing logistic support.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Funding** This research was primarily supported by a grant from the Secretary of Research and Technology of National University of Río Cuarto (PPI 18/C416) and National Agency for Scientific and Technological Promotion FONCYT (BID-PICT 0932-2012; BID-PICT 2533-2014). The first, second, third, and four authors thank CONICET - Argentina (Argentinean National Research Council for Science and Technology) for fellowships granted. The investigation was conducted according to the state law “Protection and Conservation of Wild Fauna” (Argentina National Law No. 22.421). Our study was authorized by Córdoba Environmental Agency (A.C.A.S.E.), Environmental Secretary of Córdoba Government.

## References

- Addy K, Green L, Herron E (2004) pH and alkalinity. University of Rhode Island, Kingston
- Antunes SC, Castro BB, Nunes B, Pereira R, Gonçalves F (2008) In situ bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:620–631
- APHA-AWWA (1999) Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. Lenore, Clescerl, Greenberg y Eaton (eds.) American Public Health Assoc., American Water Works Assoc., Water Environment Federation pp 1325
- Attademo AM, Cabagna Zenklusen M, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Junges C, Bassó A (2011) B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). *Ecotoxicology* 20:274–282
- Attademo AM, Peltzer PM, Lajmanovich RC, Cabagna Zenklusen MC, Junges CM, Basso A (2013) Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environ Monit Ass* 186: 635–649
- Ayllon F, Garcia Vazquez E (2000) Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat Res-Gen Tox En* 467(2):177–186
- Babini MS, Bionda CL, Salas NE, Martino AL (2015) Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicol Environ Saf* 118:118–125
- Barbier O, Arreola Mendoza L, Del Razo LM (2010) Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact* 188:319–333
- Barni S, Boncompagni E, Grosso A, Bertone V, Freitas I, Fasola M, Fenoglio C (2007) Evaluation of *Rana snkesculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquat Toxicol* 81:45–54
- Beutler E (1985) Chemical toxicity of the erythrocyte. In: Irons RD (ed) *Toxicology of the blood and bone marrow*. Raven press, New York, p 182
- Bionda CL, Lajmanovich RC, Salas NE, Martino AL, di Tada IE (2011) Reproductive ecology of the common South American toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. *J Herpetol* 45:261–264
- Bosch B, Mañas F, Gorla N, Aiassa D (2011) Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *J Toxicol Environ Health Sci* 3(6):154–163
- Boyd CE (1982) *Water quality management for pond fish culture*. Elsevier Scientific Publication Company, Netherland, p 318
- Caims J Jr, Heath AG, Parker BC (1975) The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47: 135–171
- Camargo JA (2003) Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere* 50:251–264
- Canadian Council of Ministers of Environment (CCME) (2002) *Canadian water quality guidelines for protection of aquatic life: inorganic fluorides*. pp 1–4
- Cañedo Argüelles M, Kefford BJ, Piscart C, Prat N, Schäfer RB, Schulz CJ (2013) Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. *Environ Pollut* 173:157–167
- Cantú MP, Degiovanni SB (1984) Geomorfología de la región centro sur de la provincia de Córdoba. In IX Congreso Geológico Argentino, Asociación Geológica Argentina. *Actas* 4:76–92
- Carrasco KR, Tilbury KL, Mayers MS (1990) Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. *Can J Fish Aquat Sci* 47:2123–2136
- Castro BB, Guilhermino L, Ribeiro R (2003) In situ bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*. *Environ Pollut* 125(3):325–335
- Collins SJ, Russell RW (2009) Toxicity of road salt to Nova Scotia amphibians. *Environ Pollut* 157(1):320–324
- Coniglio J (2006). Evolución petrológica y metalogenética del batolito Cerro Áspero en relación con el ciclo geoquímica endógeno del Flúor, Sierras de Comechingones, Córdoba, Argentina. Tesis doctoral UNRC pp 163 in Spanish
- Coniglio J, D'Eramo, F, Pinotti L, Demartis M, Petrelli H (2006) Magmatismo devónico de las sierras de Córdoba: fuente posible de flúor de las mineralizaciones mesozoicas el ejemplo del batolito cerro áspero. VIII Congreso de Mineralogía y Metalogía. *Actas* 1 pp 227–232 in Spanish
- Crott JW, Mashiyama ST, Ames BC, Fenech M (2001) The effect of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on chromosome damage in human lymphocytes in vitro. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1089–1096
- da Silva Corrêa SA, de Souza Abessa DM, Gomes do Santos L, Bezerra da Silva E, Seriani R (2016) Differential blood counting in fish as a non-destructive biomarker of water contamination exposure. *Toxicol Environ Chemistry*:1–10
- da Silva Souza T, Fontanetti CS (2006) Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Toxicol Environ Mut* 605:87–93
- Dacie JV, Lewis SM (1984) *Practical hematology*. Churchill Livingstone, New York
- Davis AK (2009) Metamorphosis-related changes in leukocyte profiles of larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Comp Clin Pathol* 18(2):181–186
- Davis AK, Maney DL, Maerz JC (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct Ecol* 22: 760–772
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2012). Grupo InfoStat Professional, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina <http://www.infostat.com.ar> S in Spanish
- Djomo JE, Ferrier V, Békaert C (2000) Amphibian micronucleus test in vivo (Jaylet test) to evaluate the genotoxicity of petrochemical waste waters. *Bull Environ Contam Toxicol* 65:168–174
- Duellman WE, Trueb L (1994) *Biology of amphibians*. John Hopkins University Press, Baltimore
- Eggen RI, Behra R, Burkhardt Holm P, Escher BI, Schweigert N (2004) Peer reviewed: challenges in ecotoxicology. *Environ Sci Technol* 38(3):58A–64A
- Ergene S, Çavaş T, Çelik A, Köleli N, Kaya F, Karahan A (2007) Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology* 16:385–391
- Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455: 81–95
- Fenech M, Kirsch Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26:125–132
- García G, Fontúrbel F (2003). *Propuestas para un desarrollo sostenible. Lago Titikaka por estrategias K*. Ed. Publicaciones Integrales. La Paz in Spanish
- Gauthier L, Tardy E, Mouchet F, Marty J (2004) Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Sci Total Environ* 323(1):47–61
- Gonzalo C, Camargo JA (2012) Fluoride bioaccumulation in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) as suitable bioindicator of fluoride pollution in freshwater ecosystems. *Ecol Indic* 20:244–251

- Guilherme S, Válega M, Pereira ME, Santos MA, Pacheco M (2008) Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotoxicol Environ Saf* 70(3):411–421
- Heyer WR, Donnelly MA, Mcdiarmid RW, Hayek LC, Foster MS (1994) Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. (Eds.). Washington, Smithsonian Institution Press, pp 364
- Hoffman DJ, Rattner BA, Burton Jr GA, Cairns Jr J (eds) (2010) Handbook of ecotoxicology. CRC Press, London, New York, Washington
- Howe GE, Gillis R, Mowbray RC (1998) Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. *Environ Toxicol Chem* 17(3):519–525
- Karraker NE, Ruthig GR (2009) Effect of road deicing salt on the susceptibility of amphibian embryos to infection by water molds. *Environ Res* 109(1):40–45
- Lajmanovich RC, Cabagna Zenklusen MC, Attademo AM, Junges CM, Peltzer PM, Bassó A, Lorenzatti E (2014) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Toxicol Environ Mutagen* 769:7–12
- Lancôt C, Bennett W, Wilson S, Fabbro L, Leusch FDL, Melvin SD (2016) Behaviour, development and metal accumulation in striped marsh frog tadpoles (*Limnodynastes peronii*) exposed to coal mine wastewater. *Aquat Toxicol* 173:218–227
- Lavoie I, Lavoie M, Fortin C (2012) A mine of information: benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings. *Sci Total Environ* 425:231–241
- Law 24051 (1992) Ley Nacional de Residuos Peligrosos (Regime for hazardous wastes). Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Argentina. On line <http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/residuos/ley24051.htm>. [http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/residuos/dec831/dec831\\_anxIV.htm](http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/residuos/dec831/dec831_anxIV.htm) Access 19 Feb 2016 in Spanish
- Livingstone DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Technol Biot* 57:195–211
- Machado da Rocha C (2011) The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tool for xenobiotic exposure risk assessment: a brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to copper sulphate. *J Sci Res* 8(1):23–29
- Marques SM, Antunes SC, Pissarra H, Pereira ML, Gonçalves F, Pereira R (2009) Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. *Aquat Toxicol* 91:187–195
- Martino AL, Sinsch U (2002) Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *J Zool* 257:67–81
- Nöller HG (1959) Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. *Pflüg Arch Physiol* 269:98–100
- Pollo FE, Salas NE, Mancini MA, Martino AL (2012) Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas. *Acta Toxicol Arg* 20:62–67 in Spanish
- Pollo FE, Bionda CL, Salinas ZA, Salas NE, Martino AL (2015) Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environ Monit Assess* 187(9):1–9
- Pollo FE, Grenat PR, Otero MA, Salas NE, Martino AL (2016) Assessment in situ of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. *Ecotoxicol Environ Saf* 133:466–474
- Prieto Z, Incio JL, Quijano Jara C, Fernández R, Polo Benites E, Vallejo Rodríguez R, Villegas Sanchez L (2008) Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (Tilapia). *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 25:51–58
- Romanova EB, Egorikhina MN (2006) Changes in hematological parameters of *Rana* frogs in a transformed urban environment. *Russ J Ecol* 37(3):188–192
- Sanabria EA, Quiroga LB, Acosta JC (2007) Sitios de oviposición y esfuerzo reproductivo en *Chaunus arenarum* (Anura: Bufonidae) en el desierto del Monte, Argentina. *Rev Esp Herpet* 21:49–53 in Spanish
- Sanzo D, Hecnar SJ (2006) Effects of road de-icing salt (NaCl) on larval wood frogs (*Rana sylvatica*). *Environ Pollut* 140(2):247–256
- Schmid W (1975) The micronucleus test. *Mutat Res* 31:9–15
- Seriani R, Abessa DM, Moreira LB, Cabrera JP, Sanches JQ, Silva CL, Amorim FA, Rivero D, Silva FL, Fitorra L, Carvalho Oliveira R, Macchione M, Ranzani Paiva M (2015) In vitro mucus transportability, cytogenotoxicity, and hematological changes as non-destructive physiological biomarkers in fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 112:162–168
- Serrano García L, Montero Montoya R (2001) Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ Mol Mutagen* 38:38–45
- Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM (1998) Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol* 140:1307–1320
- Strunjak Perovic I, Popovic NT, Coz Rakovac R, Jadan M (2009) Nuclear abnormalities of marine fish erythrocytes. *J Fish Biol* 74:2239–2249
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306:1783–1786
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW (1992) Micronuclei and other anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 271:69–77
- Udroiu I (2006) The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat Toxicol* 79:201–204
- Valenzuela AE, Silva VM, Klempau AE (2006) Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture* 251:596–602
- Venturino A, Rosenbaum E, Caballero De Castro A, Anguiano OL, Gauna L, Fonovich De Schroeder T, Pechen De D'Angelo AM (2003) Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8(3–4):167–186
- Vera Candiotti JV, Natale GS, Soloneski S, Ronco AE, Larramendy ML (2010) Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere* 78:249–255
- Young B, Stuart S, Chanson J, Cox N, Boucher T (2004) Joyas que están desapareciendo: El estado de los anfibios en el nuevo mundo. *Nature Serve*, Arlington, p 53 in Spanish
- Zocche JJ, Damiani AP, Hainzenreder G, Mendonça RÁ, Peres PB, dos Santos CEI, Debastiani R, Ferraz Dias J, de Andrade VM (2013) Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-casting mine. *Environ Toxicol Pharmacol* 36(1):194–201