

Estudio de indicadores físico-químicos y toxicológicos del agua superficial del bajo río Paraná¹

Julieta Peluso²
Carolina M. Aronzon³
Cristina S. Pérez Coll⁴



Palabras clave: Anfibios; bioensayos de toxicidad; ecotoxicología; humedales; calidad del agua.

1. Introducción

Los humedales de la cuenca del río Paraná brindan bienes y servicios ecológicos que garantizan la calidad de vida de las poblaciones, desde la regulación hídrica y el ciclado de nutrientes hasta procesos asociados a la producción primaria y secundaria y provisión de hábitat. Las actividades humanas degradan los ecosistemas y llevan a una pérdida de dichos bienes y servicios. En el tramo final del río Paraná se desarrollan actividades agropecuarias e industriales que vienen generando un creciente impacto ambiental [1]. El área está densamente poblada, con ciudades como Rosario, San

1 Agradezco al Instituto de Ingeniería Ambiental (3iA) de la Universidad Nacional de San Martín, por brindar un ámbito propicio para realizar las investigaciones y fomentar el desarrollo profesional. A Ferring S.A. por proveer la gonadotropina coriónica humana. A CONICET, PIP 2014-2016 Res. 112-201301-00140-CO "Evaluación de la calidad ambiental a lo largo del tramo final del bajo Paraná. Integración de parámetros ecotoxicológicos y físico-químicos a información satelital para el uso sustentable del área", dirigido por la Dra. Pérez Coll. A mis directoras de trabajo, Carolina M. Aronzon y Cristina S. Pérez Coll, por su colaboración, aportes y apoyo a lo largo del trabajo.

2 Laboratorio de Ecotoxicología, Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (UNSAM)/CONICET, Argentina. juli.peluso@hotmail.com.

3 Laboratorio de Ecotoxicología, Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (UNSAM)/CONICET, Argentina. carolinaaronzon@hotmail.com.

4 Laboratorio de Ecotoxicología, Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (UNSAM)/CONICET, Argentina. cris060957@yahoo.com.ar.

Nicolás, Ramallo, San Pedro, Zárate y Campana, que generan una importante carga de desechos domiciliarios. Asimismo, funcionan desde parques industriales con actividades metalúrgicas hasta papeleras, curtiembres, madereras, que dan origen a efluentes que son volcados a los cursos de agua de la cuenca del río Paraná; además de una intensa producción agrícola-ganadera.

Respecto a la calidad ambiental del río Paraná, Bernasconi y otros [2] informaron acerca de niveles contaminantes de Zn, Cu, Cd, Pb, Ni y Hg en aguas y sedimentos de los ríos San Lorenzo y Saladillo y del arroyo Pavón. Asimismo se informaron sobre los niveles de Zn, Cu y Cr superiores a los niveles guía para la protección de la vida acuática en el Paraná de las Palmas [3]. Los aportes de nutrientes derivados de actividades agrícolas, ganaderas y de urbanización también deterioran el agua. Mugni y otros [4] estudiaron los valores de nutrientes (P reactivo soluble, nitrato) en un arroyo pampeano, resultando significativamente más altos en aguas próximas a parcelas cultivadas con soja-trigo y tratadas con fertilizantes, que en las aguas próximas a parcelas sin tratar. Asimismo, el P y NO_3^- fueron más altos en sitios próximos a áreas de asentamiento de ganado más que por cultivo de soja. Riglos y otros [5] estudiaron N, P y C como marcadores de actividad antrópica en sitios correspondientes a la cuenca superior, media e inferior del río Paraná, midiendo niveles de NH_4^+ que superaron los niveles guía para la protección de la vida acuática en los ríos San Lorenzo, Saladillo y Luján. Los sedimentos del río Paraná en sus tramos medio y final hasta la desembocadura del río Luján inclusive, fueron evaluados mediante estudios ecotoxicológicos con *Hyalella curvispina* [6], las muestras de las desembocaduras de los arroyos San Lorenzo, Saladillo y Pavón evidenciaron una disminución significativa en la sobrevivencia de los anfípodos expuestos. Dicha toxicidad sería consistente con la presencia de metales pesados contaminantes [2] y plaguicidas [7] en esos sitios. Este escenario revela la necesidad de monitorear el área en forma permanente y tomar decisiones basadas en conocimientos científicos, a los efectos de proteger el ecosistema y la salud humana.

Los anfibios se destacan como monitores de procesos ecosistémicos, dado que son valiosos indicadores de la calidad ambiental y desempeñan múltiples roles en los ecosistemas [8]. También, presentan una alta sensibilidad a los cambios

físico-químicos del medio acuático. Así, procesos de concentración de solutos [9] o la presencia de agroquímicos pueden afectar seriamente la calidad del hábitat para estos organismos [10]. Desde las últimas décadas, los anfibios vienen teniendo gran relevancia a nivel mundial, ya que muchas de sus poblaciones han disminuido considerablemente, y ha aumentado también la incidencia de malformaciones [11, 12]. Los anfibios aportan la mayor proporción de especies entre los vertebrados en peligro de extinción [13], siendo las principales causas la degradación y la contaminación de sus hábitats [12]. Los estanques y charcas temporales, donde se reproducen y desarrollan, reciben nutrientes y contaminantes como consecuencia de la deriva o lavado de los suelos, que se concentran por la radiación solar en primavera-verano, coincidiendo con la época reproductiva y las etapas más susceptibles del ciclo de vida de los anfibios [12].

En particular, *Rhinella (Bufo) arenarum* tiene una amplia distribución en Sudamérica, identificándose como una de las especies con mayor incidencia de malformaciones en la región media-este de la Argentina, zona dominada principalmente por la agricultura. Bionda y otros [14], registraron una disminución en la masa corporal de las larvas de *R. arenarum* que habitan zonas agrícolas, como consecuencia de una disminución en la alimentación, en comparación con las larvas de los sitios controles. Estos posibles efectos de los ambientes modificados pueden comprometer la continuidad de la población, alterando la supervivencia, reproducción y reclutamiento [15, 16, 17].

Los bioensayos de toxicidad en laboratorio constituyen una herramienta de diagnóstico realista, que se ajusta a las necesidades actuales facilitando la toma de decisiones frente a los problemas planteados por la contaminación. Para obtener informes ecotoxicológicos representativos de la fauna herpetológica argentina, se desarrolló el test estandarizado de toxicidad AN-FITOX [18], que utiliza embriones y larvas de *R. arenarum* para evaluar la toxicidad aguda, crónica corta y crónica en distintos estadios tempranos del desarrollo.

Así, la evaluación ecotoxicológica en diferentes etapas del ciclo de vida de los anfibios, junto al análisis de parámetros físico-químicos del agua, resultan de suma utilidad ya que contribuyen a una evaluación integrada del impacto de la contaminación sobre el ecosistema.

2. Metodología

2.1. Muestreo de agua superficial

El diseño de muestreo y el procedimiento de toma de muestras de agua superficial, fraccionamiento, preservación y conservación se realizaron siguiendo las recomendaciones y consideraciones del documento PT-Mu-02 “Muestreo de aguas superficiales” [19]. En el marco de un estudio preliminar se realizó una primera campaña de muestreo de agua en abril de 2016, en dos sitios de estudio. El primer punto fue sobre el arroyo de la Cruz (S1: S 34° 08' 587" O 58° 59' 174"), en el partido de Campana, el cual atraviesa zonas industriales; mientras que el segundo punto fue sobre el río Arrecifes (S2: S 33° 49' 80" O 59° 35' 601"), en el partido de Baradero, cuyas aguas circulan por amplios campos de cultivo (figura 1).

2.2. Medición de parámetros físico-químicos *in situ*

En cada sitio se midieron los siguientes parámetros: pH (Adwa AD12), penetración luminosa con disco de Secchi, temperatura, oxígeno disuelto (OD, Lutron PDO-519), conductividad eléctrica (CE, Adwa AD203) y profundidad.

2.3. Medición de parámetros físico-químicos en laboratorio

Los sólidos suspendidos totales se midieron por filtración de las muestras en filtros GF/F hasta saturación de los mismos.

Los aniones se midieron en muestras conservadas a 4 °C. DBO5 (Método del oxígeno disuelto) y DQO (Método HACH 8000), nitrógeno amoniacal (Método 8155), fosfatos (Método 8048), nitratos (Método 8039), nitritos (Método 8153), cloruros (Método 8113) utilizando un espectrofotómetro HACH DR. Además, se determinó la concentración de los siguientes metales pesados por ICP-masa: Ar, Cu, Cr, Ni, Pb, Zn.

Con dichos resultados se calcularon dos Índices de Calidad de Agua (ICA): el ICA de Berón 1994 [20] y el ICA del Water Research Center [21].

2.4. Bioensayos de toxicidad

La toxicidad de las muestras de agua se evaluó mediante bioensayos estandarizados de laboratorio (ANFITOX) crónicos (21 días) con embriones y larvas tempranas de *R. arenarum*, registrándose los efectos letales y subletales por exposición a las muestras de agua procedentes de los distintos sitios de muestreo [18].

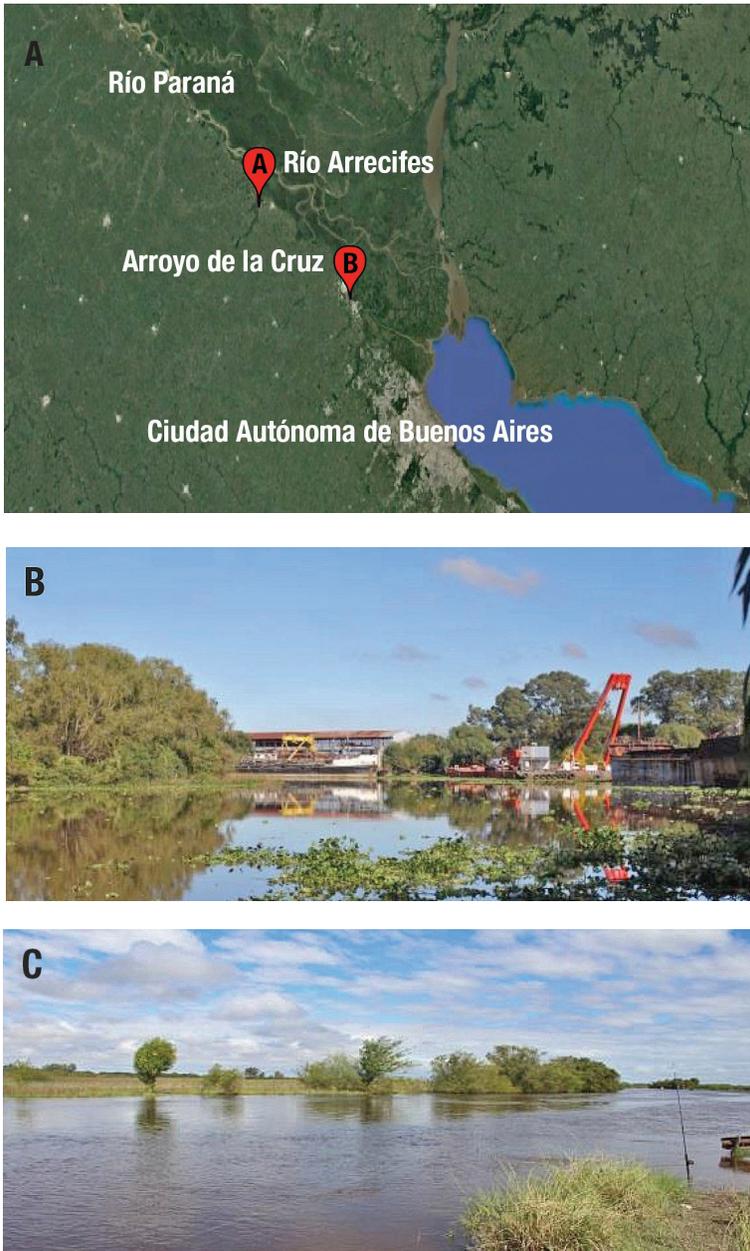


Figura 1 (A). Imagen satelital de los dos sitios de muestreo, arroyo de la Cruz (S1) y río Arrecifes (S2) (Fuente: Google Earth); (B). Foto del sitio de muestreo del arroyo de la Cruz; (C). Foto del sitio de muestreo del río Arrecifes.

Para el estudio de los efectos letales, se realizó un gradiente de dilución de las muestras compuestas (100%, 75%, 50%, 25%, 12%) preparadas en una solución salina suave ANFITOX (SA). Los bioensayos se realizaron exponiendo 10 individuos por cápsula de Petri (cubiertas, formando cámaras) con 40 ml de muestra (por triplicado) a 20 °C +/-1, en simultáneo con los correspondientes controles en SA. Los ensayos fueron semiestáticos (renovación completa del medio cada 48 h), la supervivencia fue evaluada diariamente descartando los organismos muertos. Se analizaron los datos de sobrevivencia utilizando el programa Probit a fin de determinar las Concentraciones Letales 50 (CL50) [22].

A partir de los bioensayos se evaluaron también, cada 24 h, los efectos subletales como: alteraciones en la morfogénesis, anomalías en la distribución del pigmento, descamación, incurvaciones del eje y edemas. Asimismo, se evaluaron alteraciones en el progreso del desarrollo, inhibición en el crecimiento y desórdenes neurológicos. El estudio de los efectos letales y subletales se realizó bajo lupa estereoscópica y fotografía.

3. Resultados

3.1. Resultados de la medición de los parámetros físico-químicos

Con respecto a los parámetros físico-químicos, se destacan los bajos valores de OD. Además, la concentración de nitritos de la muestra del río Arrecifes presentó el mismo valor que el establecido por el Decreto 831/93, encontrándose en el límite de lo permitido. Para dicho sitio sucedió lo mismo con el valor de arsénico (tabla 1).

En cuanto a los metales, las concentraciones de Cu fueron mayores a lo reglamentado por el Decreto 831/93 para la protección de la vida acuática (tabla 1).

Parámetro	S1	S2	Valor guía (Decreto 831/93)
Temperatura °C	22	22	ND*
pH	7,29	8,01	ND
OD (mg/L)	3,4	4,1	ND
Conductividad (uS/L)	411	1613	ND

Sólidos susp. totales (g/L)	0,0172	0,063	ND
Sólidos volátiles (g/L)	0,007	0,015	ND
Sólidos fijos (g/L)	0,0102	0,048	ND
Amonio (mg/L)	0,18	0,11	1,37
Fosfato (mg/L)	1,9	4,4	ND
Nitrato (mg/L)	0,6	0,19	ND
Nitrito (mg/L)	0,022	0,06	0,06
Cloruros (mg/L)	14,4	84	ND
DBO ₅ (mg/L)	2	3,35	ND
DQO (mg/L)	53	62	ND
Arsénico (ug/L)	5,7	46	50
Cobre (ug/L)	3	4	2
Cromo (ug/L)	0,4	0,9	2
Níquel (ug/L)	1,2	1	25
Plomo (ug/L)	0,6	0,5	1
Zinc (ug/L)	9,3	6,1	30

*ND: No disponible por bibliografía.

Tabla 1. Parámetros físico-químicos medidos *in situ* y en laboratorio para las muestras de agua del arroyo de la Cruz (S1) y el río Arrecifes (S2).

Los ICA indican niveles de contaminación intermedia para ambos sitios, aunque se observan valores aún más bajos en S2 reflejando una menor calidad del agua en ese sitio (tabla 2).

ICA	S1	S2
ICA Water Research Center	57	53
ICA Berón, 1994	7,5	7
Clasificación	Polución leve	Polución leve

Tabla 2. Índices de calidad de agua para las muestras de agua del arroyo de la Cruz (S1) y el río Arrecifes (S2) según Water Research Center y Berón (1994).

3.2. Resultados de los bioensayos de toxicidad en la etapa embrionaria

En las figuras 2A y 2B se pueden observar las curvas de sobrevivencia, indicando el porcentaje de supervivencia de los embriones expuestos a diluciones de las muestras compuestas de cada sitio en función del tiempo.

Para S1 se puede observar un patrón de toxicidad marcado, en el cual la concentración 100% de la muestra causó una mayor mortalidad en comparación al control SA a partir de las 48 h, mientras que la concentración 12% no presentó diferencias significativas con SA a lo largo de las 504 h (figura 2A). Además, para dicho sitio se pudieron calcular las CL_{50} , con sus intervalos de confianza a partir del período agudo, siendo de 54,7% (15,5%-30,5%) a las 96 y 168 h, y disminuyendo a las 504 h a 49% (21%-22,6%); sin presentar diferencias significativas entre sí.

Para S2 se puede observar que el porcentaje de sobrevivencia se mantuvo constante para las diferentes concentraciones a lo largo de las 504 h, sin presentar mortalidad significativa en comparación al control SA (figura 2B).

A su vez, la toxicidad de las muestras ambientales por exposición crónica resultó significativamente diferente entre ambos sitios, pudiéndose observar una mayor mortalidad en S1.

Con respecto a las malformaciones, se observó que para los tres tiempos de exposición, S2 causó un mayor porcentaje de malformaciones el cual resultó máximo a las 48 h, llegando a 83,9% y disminuyendo en tiempos más avanzados a un 12,7% correspondiéndose con un aumento en la mortalidad de los individuos (figura 3).

3.3. Resultados de los bioensayos de toxicidad en la etapa larval

En las figuras 4A y 4B se pueden observar las curvas de sobrevivencia, en las que se indica el porcentaje de supervivencia de las larvas expuestas a diluciones de las muestras compuestas de cada sitio en función del tiempo.

Para S1 se puede observar que no hubo mortalidad significativamente diferente a la de los controles, manteniéndose la sobrevivencia constante a lo largo del tiempo para las diferentes diluciones (figura 4A).

Para S2 se observa una mortalidad significativa a partir de las 114 h para la concentración 100% en comparación al control SA, sin registrarse mortalidad significativa en las demás diluciones (figura 4B).

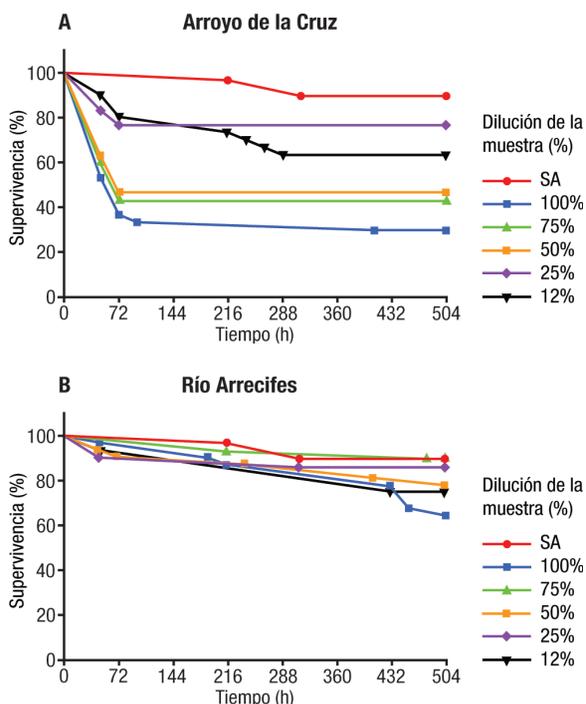


Figura 2 (A). Curva de sobrevivencia de embriones de *R. arenarum* expuestos a un gradiente de diluciones de la muestra de agua del arroyo de la Cruz por 504 h; (B). Curva de sobrevivencia de embriones de *R. arenarum* expuestos a un gradiente de diluciones de la muestra de agua del río Arrecifes por 504 h.

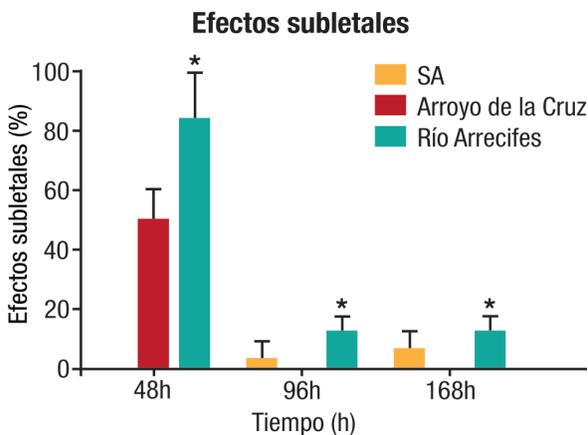


Figura 3. Porcentaje de efectos subletales en embriones de *R. arenarum* por exposición a las muestras compuestas de agua del arroyo de la Cruz y del río Arrecifes al 100% evaluadas en tres tiempos diferentes (*Diferencia significativa con el control SA).

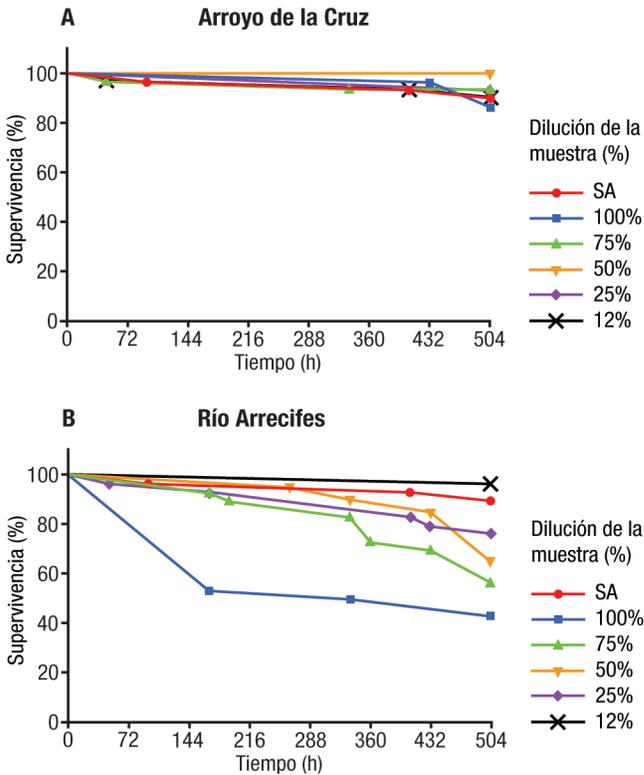


Figura 4. (A). Curva de sobrevivencia de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a un gradiente de diluciones de la muestra de agua del arroyo de la Cruz por 504 h; (B). Curva de sobrevivencia de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a un gradiente de diluciones de la muestra de agua del río Arrecifes por 504 h.

Respecto a lo observado en la exposición en la etapa embrionaria, se registró una inversión en el patrón de toxicidad en la etapa larval, en la que la muestra de agua de S2 causó una mayor mortalidad, mientras que la de S1 no causó mortalidad significativa.

4. Discusión

Con respecto a los parámetros físico-químicos, se observa una degradación en la calidad del agua de ambos sitios en el período evaluado, viéndose reflejado en los valores de los ICA, los

cuales muestran una polución leve de acuerdo con los parámetros de ambas muestras. Según ambos ICA, el río Arrecifes presenta una menor calidad de agua en comparación al arroyo de la Cruz; probablemente porque dicho sitio tiene una mayor cantidad de parámetros con valores próximos o directamente fuera del límite establecido para la protección de la vida acuática, tales como nitritos, arsénico y cobre.

Por un lado, el río Arrecifes presentó una mayor concentración de nitritos en las aguas, próximo al límite de lo permitido para la protección de la vida acuática establecido por el Decreto 831/93 [23]. Este hecho podría deberse al uso de fertilizantes nitrogenados en los campos con alta actividad agrícola por los cuales atraviesa dicho río [24, 25], y/o a una alta carga ganadera [25].

Por otro lado, se esperaba encontrar valores más altos de metales pesados en las muestras de agua del arroyo de la Cruz debido a la pesada actividad industrial de la zona, sin embargo, solo se encontraron niveles de Cu mayores a lo reglamentado en ambos sitios y concentraciones de OD bajas (Decreto 831/93) [23]. Más aún, en la muestra de agua del río Arrecifes se encontraron niveles de Cu, As y Cr más altos en comparación al arroyo de la Cruz, pudiendo estar relacionado con la degradación de pesticidas que contienen en su formulado metales pesados [26].

El arroyo de la Cruz causó una mayor toxicidad sobre los embriones, mientras que la exposición de los embriones al agua del río Arrecifes produjo una mayor incidencia de malformaciones. Por otro lado, si bien los pesticidas no fueron analizados en estas muestras, se sabe que muchos pesticidas causan efectos subletales en los embriones de *R. arenarum*, lo cual podría correlacionarse con los efectos causados por el río Arrecifes sobre dicho estadio [por ejemplo, 29]. Si bien estos efectos no son letales a corto plazo, pueden afectar el normal desarrollo de los individuos y disminuir el fitness de los mismos, afectándolos niveles poblacionales.

En el estadio larval se observó una inversión en el patrón de toxicidad con respecto a la etapa embrionaria, por lo cual las muestras de agua del río Arrecifes causaron una mayor letalidad. Este estudio destaca la importancia de evaluar los efectos en distintos estadios del desarrollo cronificando la exposición, además de evaluar también los efectos subletales. Además de que las larvas expuestas a altas concentraciones de nitrito nadan con dificultad, muestran fallas en el equilibrio y parálisis, sufren anomalías y edemas y, eventualmente, mueren [30].

Si bien estos resultados corresponden a un estudio preliminar, de una única campaña de muestreo, y es necesario continuar con el monitoreo a lo largo del tiempo, este estudio alerta sobre la degradación del río Paraná en su cuenca baja y la utilidad de las herramientas empleadas para utilizarse en la toma de decisiones para la protección de humedales.

Bibliografía

[1] **Kandus, P.; Quintana, R. y Bó, R. F.** (2006). *Patrones de paisajes y biodiversidad del Bajo Delta del Río Paraná: mapa de ambientes*. Buenos Aires, Pablo Casamajor Ediciones.

[2] **Bernasconi, C. et al.** (2010). “Monitoreo de los principales afluentes del río Paraná: Cadmio, Cobre, Cromo, Niquel, Plomo y Zinc en aguas, sedimentos y biota”, en: *Libro de resúmenes. III Congreso Argentino SETAC “Ecotoxicología: reflexiones en el año del Bicentenario”*. Santa Fe, pp. 95-96.

[3] **Cataldo, D. et al.** (2001). “Environmental toxicity assessment in the Paraná River delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles”, *Environmental Pollution* 112, pp. 379-389.

[4] **Mugni, H.; Paracampo, A. y Bonetto, C.** (2013). “Nutrient Concentrations in a Pampasic First Order Stream with Different Land Uses in the Surrounding Plots (Buenos Aires, Argentina)”, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 91(4), pp. 391-395.

[5] **Riglos, C.; Abelando, M. y Apartin, C.** (2010). “Monitoreo de los principales afluentes del río Paraná: análisis de nutrientes”, en: *Libro de resúmenes III. Congreso Argentino SETAC “Ecotoxicología: reflexiones en el año del Bicentenario”*. Santa Fe.

[6] **Peluso, L. et al.** (2013). “Integrated ecotoxicological assessment of bottom sediments from the Paraná basin, Argentina”, *Ecotoxicology and environmental safety* 98, pp. 179-186.

[7] **Marino, D. y Ronco A.** (2005). “Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina”, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 75(4), pp. 820-826.

[8] **Ossana, N. A.; Castañé, P. M. y Salibián A.** (2013). “Use of *Lithobates catesbeianus* Tadpoles in a Multiple Biomarker Approach for the Assessment of Water Quality of the Reconquista River (Argentina)”, *Archives of environmental contamination and toxicology*, 65(3), pp. 486-497.

- [9] Ortiz-Yusty, C. E.; Páez, V. y Zapata, F. A. (2013). "Temperature and precipitation as predictors of species richness in northern Andean amphibians from Colombia", *Caldasia*, 35(1), pp. 65-80.
- [10] Blaustein, A. R. *et al.* (2003). "Ultraviolet radiation, toxic chemicals, and amphibian population declines", *Diversity and distributions*, 9(2) pp. 123-140.
- [11] Wake, D. B. y Vredenburg, V. T. (2008). "Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (Suppl. 1), pp. 11466-11473.
- [12] Mann, R. M. *et al.* (2009). "Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment", *Environmental pollution*, 157(11), pp. 2903-2927.
- [13] Stuart, S. *et al.* (2004). "Status and trends of amphibian declines and extinctions world wide", *Science* 306, pp. 1783-1786.
- [14] Bionda, C. *et al.* (2012). "Ecología trófica en larvas de *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en agroecosistemas y sus posibles implicaciones para la conservación", *Revista de Biología Tropical*, 60(2).
- [15] Wilbur, H. M. (1980). "Complex life cycles", *Annual review of Ecology and Systematics*, 11(1), pp. 67-93.
- [16] Semlitsch, R. D.; Scott, D. E. y Pechmann, J. H. (1988). "Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma tigrinum*", *Ecology*, 69(1), pp. 184-192.
- [17] Gray, M. J. y Smith, L. M. (2005). "Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians", *Journal of Wildlife Management*, 69(2), pp. 515-524.
- [18] Perez Coll, C. S.; Aronzon, C. M. y Svartz, G. V. (2017). "Developmental stages of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) in toxicity studies: AMPHITOX, a customized laboratory assay", en: *Ecotoxicology and genotoxicology: Non-traditional aquatic models*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry-Thomas

Graham House Science Park (en prensa).

[19] **Alberro, N. et al.** (2011). *Manual de protocolos armonizados y evaluados para la toma de muestra y análisis de agua y sedimentos para la Región de América Latina y el Caribe*. Ed. por P. Bedregal. Lima, Agencia Internacional de Energía Atómica.

[20] **Berón, L.** (1984). *Evaluación de la calidad de las aguas de los ríos de la Plata y Matanza-Riachuelo mediante la utilización de índices de calidad de agua*. Argentina, Secretaría de Vivienda y Ordenamiento Ambiental. Ministerio de Salud y Acción Social.

[21] **Water Research Center** (2016). "Monitoring the Quality of Surface Waters", disponible en <http://www.water-research.net/index.php/water-treatment/water-monitoring/monitoring-the-quality-of-surfacewaters> (accedido en octubre de 2016).

[22] **USEPA** (1988). *Users guide for a computer program for PROBIT analysis of data from acute and short-term chronic toxicity test with aquatic organisms*. Biological Methods, Environmental Monitoring and Support Lab: United States Environmental Protection Agency.

[23] **Diario Oficial de la República Argentina** (1993). Decreto 831/93.

[24] **Antón, A. y Lizaso, J.** (2003). *Nitritos, nitratos y nitrosaminas*. Madrid, Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria.

[25] **Marco, A.** (2002). "Contaminación global por nitrógeno y declive de anfibios", *Revista española de herpetología* 16, pp. 5-17.

[26] **Zúñiga, F. B.** (1999). *Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados*. Vol. 1. México, Universidad Autónoma de Yucatán.

[27] **Sztrum, A.** (2010). *Susceptibilidad diferencial al níquel en distintos estadios del desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum**, tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

[28] **Aronzon, C. M.** (2013). *Evaluación de la toxicidad de los contaminantes Cobre, Nonilfenol y Diazinón sobre embriones y larvas de Rhinella (Bufo) arenarum*, tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

[29] **Lascano, C. I. et al.** (2009). "Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*", *Acta toxicológica argentina*, 17(1), pp. 8-19.

[30] **Baker, J. y Waights, V.** (1999). "The effect of sodium nitrate on the growth and survival of toad tadpoles (*Bufo bufo*) in the laboratory", *Herpetological Journal* 3, pp. 147-148.