

Anfibios en agroecosistemas forestales del Uruguay: una herramienta para el biomonitoreo.

MSc. Gisela Pereira
Junio de 2024



Tesis de Doctorado: “Anfibios en agroecosistemas forestales del Uruguay: una herramienta para el biomonitoreo”.

PEDECIBA/Biología/Zoología.

Autor: Gisela Pereira – gpereira@fcien.edu.uy.

Orientador: Dr. Raúl Maneyro.

Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados – Herpetología.

Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales.

Facultad de Ciencias.

Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay.

Co-Orientador: Dr. Rafael Lajmanovich.

Laboratorio de Ecotoxicología.

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Tribunal: Dra. María Laura Lavaggi, Dra. Laura Verrastro y Dr. Walter Norbis.

Montevideo, Uruguay

Junio de 2024

Citar como: Pereira, G. 2024. Anfibios en agroecosistemas forestales del Uruguay: una herramienta para el biomonitoreo. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN GENERAL	13
Intensificación agrícola y sus efectos	13
Situación en Uruguay	14
Los anfibios y su potencial como bioindicadores.....	15
Los anfibios en estudios de ecotoxicología	16
Abordajes experimentales.....	16
Uso de biomarcadores.	18
Efectos de la forestación y del uso de agroquímicos sobre los anfibios: antecedentes.	19
Las especies de estudio: <i>Leptodactylus luctator</i> (Hudson, 1892); <i>Physalaemus</i> <i>gracilis</i> (Boulenger, 1883); y <i>Pseudis minuta</i> (Günther, 1859).	21
Presentación de la Tesis.....	23
BIBLIOGRAFÍA	24
CAPÍTULO 1. Efectos de la actividad forestal sobre los ensambles de anfibios anuros en el departamento de Treinta y Tres, Uruguay.....	37
INTRODUCCIÓN.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
Área de estudio y sitios de muestreo	40
Riqueza y composición de anfibios en los sitios de muestreo.....	42
Caracterización de los sitios de muestreo.....	42
Índice de Condición Corporal (BCI) en individuos adultos de <i>Pseudis minuta</i>	43
Parámetros de las células sanguíneas (MN y ENA) en larvas de <i>Pseudis minuta</i> .	44
Análisis de datos.....	45
RESULTADOS	46
Caracterización de los sitios de muestreo.....	46
Riqueza y composición de anfibios en los sitios de muestreo.....	47
Índice de Condición Corporal (BCI) y parámetros de las células sanguíneas en <i>Pseudis minuta</i>	52
DISCUSIÓN.....	53
Riqueza y composición de anfibios	54

Índice de Condición Corporal y parámetros de las células sanguíneas en <i>Pseudis minuta</i>	55
BIBLIOGRAFÍA	56
CAPÍTULO 2. Toxicidad de sedimentos en charcos asociada a la aplicación de agroquímicos en un sitio forestal: su efecto sobre larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> (Anura: Leptodactylidae).	63
INTRODUCCIÓN	64
MATERIALES Y MÉTODOS	65
Sitio de estudio	65
Muestreo de sedimentos	66
La especie de prueba	67
Colecta y mantenimiento de larvas de <i>Physalaemus gracilis</i>	67
Diseño experimental: experimentos de mesocosmos	67
Respuestas biológicas	69
Mortalidad, desarrollo y crecimiento	69
Anormalidades morfológicas	69
Parámetros de las células sanguíneas (MN y ANE)	70
Metamorfos	70
Análisis químicos	70
Análisis de Datos	71
Variables fisicoquímicas del agua	71
Mortalidad, desarrollo y crecimiento	71
Anormalidades morfológicas y variables de las células sanguíneas	72
Metamorfos	72
RESULTADOS	72
Párametros del agua y sedimentos	73
Respuestas biológicas	75
Mortalidad, desarrollo y crecimiento	75
Anormalidades morfológicas	76
Parámetros de las células sanguíneas (MN y ANE)	78
Metamorfos	79
DISCUSIÓN	81
Mortalidad, desarrollo y crecimiento	82
Anormalidades morfológicas	83
Parámetros de las células sanguíneas	84

Metamorfos.....	85
BIBLIOGRAFÍA	87
CAPÍTULO 3. Toxicidad aguda y genotoxicidad del herbicida Dual Gold®, a base de S-metolaclopro sobre larvas de <i>Leptodactylus luctator</i> (Anura: Leptodactylidae).	97
INTRODUCCIÓN.....	98
MATERIALES Y MÉTODOS.....	100
Químicos.....	100
La especie de prueba: <i>Leptodactylus luctator</i>	100
Colecta y mantenimiento de larvas de <i>Leptodactylus luctator</i>	100
Diseño experimental	101
Bioensayos de CL ₅₀	101
Genotoxicidad.....	101
Análisis de genotoxicidad: Test de MN	102
Análisis de datos.....	102
RESULTADOS	103
DISCUSIÓN	107
BIBLIOGRAFÍA	110
CAPÍTULO 4. Efectos subletales provocados por una formulación comercial de S-metolaclopro sobre larvas de <i>Leptodactylus luctator</i> (Anura: Leptodactylidae), a diferentes niveles de organización.....	118
INTRODUCCIÓN.....	119
MATERIALES Y MÉTODOS.....	121
La especie de prueba.....	121
Colecta y mantenimiento de larvas de <i>Leptodactylus luctator</i>	121
Diseño experimental	121
Efectos subletales	122
Nivel individual	122
Nivel celular	124
Análisis de datos	125
RESULTADOS	126
Efectos subletales	126
Crecimiento y desarrollo	126
Anormalidades morfológicas.....	127
MN y ENA	129
DISCUSIÓN.....	131

Efectos subletales	131
Crecimiento y desarrollo	131
Anormalidades morfológicas.....	132
MN y ENA	134
BIBLIOGRAFÍA	135
Conclusiones generales de la Tesis y perspectivas de trabajo.	144
ANEXO I	149
ANEXO II.....	180
ANEXO II.....	196
ANEXO III	201

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar, quiero agradecerles a mis orientadores, el Dr. Raúl Maneyro y el Dr. Rafael Lajmanovich. Gracias Raúl, por haberme acompañado todos estos años, desde mis estudios de grado, pasando por la maestría y ahora por el doctorado. Gracias por confiar en mí, y por apoyarme en el desafío de trabajar en esta línea. A Rafael también le agradezco por su confianza, por compartir sus conocimientos de manera tan generosa, y por estar siempre a disposición para brindarme su ayuda a pesar de los kilómetros.
- También quiero agradecerles a la Dra. María Laura Lavaggi, a la Dra. Laura Verrastro, y al Dr. Walter Norbis por aceptar formar parte del tribunal evaluador de esta Tesis, y por sus valiosos aportes que enriquecieron este trabajo.
- A PEDECIBA-Biología, a la Comisión Académica de Posgrado (CAP) de la UdelaR, y a ADUR-Ciencias, por el apoyo financiero otorgado a través de alcúotas y becas; indispensables para la realización de esta Tesis.
- A todos mis compañeros del Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados-Herpetología de la Facultad de Ciencias, los que siguen por acá y los que tomaron nuevos rumbos: Melitta Meneghel, Raúl Maneyro, Ernesto Elgue, Mariabelén Riero, Joaquín Villamil, Jennifer González, Federico Máspoli, Lucía Moreira, Juan Pablo Llopart, Mikaela Cúparo, Paula Ferrari, Moisés Escalona, Luccina Martínez, Lourdes Silvera, Manuel Laborde, Beatriz Pérez. Gracias a cada uno de ustedes por su compañía y apoyo durante todo este proceso; por escucharme, y darme ánimos cuando algo no salía como lo esperaba.
- A los compañeros del Laboratorio de Recursos Naturales, con quiénes comparto el día a día; y que siempre estuvieron presentes: Martín Bessonart, Ramiro de los Santos, Juan Gadea, Larissa Magnone y María Salhi.
- Quiero agradecerles especialmente a Eco y Belén, amigos y colegas. Gracias por todo el apoyo a lo largo de estos años, por las horas de risas y trabajo compartidas en el laboratorio y en el campo, gracias y más gracias por estar siempre dando un empujoncito.
- A Jennifer González, un agradecimiento especial, por su ayuda invaluable con los experimentos durante la pandemia, y después también; por su motivación constante y compañía. ¡Gracias Jenni!
- A Gabriela Eguren y Noelia Rivas, por recibirme siempre con tanta calidez en su laboratorio; gracias por su apoyo constante y por compartir su experiencia, así como su espacio para montar los experimentos.
- A quienes me acompañaron en alguna de las salidas de campo: Raúl, Lucía, Eco, Belén, Luccina, Paula, Jady, Esteban, Diego, y Joaquín M.

- A Daniel Ermann y Federico, Guardaparques del Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos; por acompañarnos en las salidas de campo, por su amabilidad y buena disposición.
- A las Ingenieras agrónomas Rosario Linares y Laura Arata; por recibarnos tan amablemente, por su tiempo, y por el asesoramiento brindado.
- A Cambium Forestal Uruguay.
- A Andrés Pérez del CURE-Maldonado y su equipo por la realización de los análisis químicos.
- A Diego Lercari, coordinador del Módulo Bioterio de Organismos Acuáticos de PEDECIBA, por poner a disposición el espacio para la realización de los experimentos.
- A Paola Peltzer por su ayuda, por compartir sus conocimientos tan generosamente, y por la bibliografía compartida.
- A Guillermo Chalar y Sol de Giacomi, compañeros de la sección Limnología de la Facultad de Ciencias, por su ayuda en el análisis de muestras de agua.
- A las compañeras del Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Ciencias donde pase tantas horas; Gabriela Casanova, Ana Laura Reyes, Magela Rodao, y Gabriela Martínez gracias por su calidez, por su ayuda, y buena disposición siempre.
- A Vane, Clau y Ale; amigas y colegas que siempre están dando ánimos; y también a Nico por su ayuda.
- A mis amigos por siempre estar: Lore, Guille, Mica, Malau, Lucía, Nacho; y los peques que se van sumando a este equipo: María Paz, Juanma, Santi, Theo. ¡Los quiero mucho!
- A toda mi familia: Alexis, Inés, Lorena, Margot, Aníbal, Susana, Andrea, Christian, Verónica, Diego, Graciela, y Omar. A mis hermosas sobrinas Oriana, Delfina y Julieta; y a mi ahijado Juan Martín. Gracias también a los que están desde otro lado, pero siempre conmigo, mi papá y Fernando. ¡Gracias a todos por ser mi sostén y acompañarme siempre!
- Quiero dedicarle este trabajo a mi madre, y agradecerle especialmente por su amor infinito, por ser mi apoyo incondicional, y por cuidar siempre de nosotros.
- Finalmente quiero agradecerles muy especialmente a Fede, Emi y Fran, los amores de mi vida. Gracias por ser mi motor y motivarme a ser mejor cada día.

¡A todos muchas gracias!

RESUMEN

En Uruguay, la actividad forestal ha crecido en los últimos años, superando el millón de hectáreas. Los monocultivos provocan modificaciones en la estructura del paisaje, reducción de la heterogeneidad ambiental, e impactos a nivel de los ecosistemas asociados, entre otros factores, al uso de agroquímicos. Los pesticidas y sus metabolitos son detectados en suelos y cuerpos de agua superficiales, donde pueden persistir y provocar efectos adversos a organismos acuáticos, como las larvas de anuros. Por este motivo, y por su alta sensibilidad, los anfibios son un buen modelo biológico para estudiar el efecto de estos contaminantes. Son escasos los estudios que evalúan el efecto de la actividad forestal sobre los ensambles de anfibios autóctonos. El objetivo general de esta Tesis fue evaluar los potenciales efectos de la actividad forestal sobre anfibios anuros del Uruguay, a diferentes niveles de organización. En el capítulo 1, se analizaron los cambios en la riqueza y composición de los ensambles de anuros asociados a la actividad forestal, y se determinó la incidencia de esta actividad sobre la condición corporal y los parámetros de las células sanguíneas (presencia de Micronúcleos (MN) y de otras aberraciones nucleares de los eritrocitos (ANE)) en individuos de *Pseudis minuta*. Se realizaron muestreos estacionales de machos vocalizadores y de larvas en dos sitios forestados con pinos (FA=forestación activa y FB=zona recientemente cosechada) y un sitio control (NF). La comparación de la riqueza entre los sitios de estudio se basó en curvas de rarefacción; y para evaluar las diferencias en la composición de especies se realizó un PERMANOVA. La riqueza y composición de especies entre el control y los sitios forestales fue similar. No se encontraron diferencias significativas en la condición corporal de los individuos de *P. minuta*, entre los sitios de estudio, pero se observó que la frecuencia de MN+ANE en larvas provenientes del sitio forestal fue significativamente mayor que en larvas provenientes del sitio control. Estos resultados destacan la importancia de evaluar los posibles efectos de la actividad forestal con Pinos sobre los anfibios a otros niveles de organización (ej. celular). En el capítulo 2, se profundizó el conocimiento de los efectos de la actividad forestal a nivel individual y celular en los anuros; se evaluó la toxicidad de los sedimentos de charcos de un sitio forestal bajo el manejo con agroquímicos usando a *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae), como especie bioindicadora. Las respuestas biológicas a los contaminantes se evaluaron utilizando biomarcadores morfológicos (ej. anomalías morfológicas), y citogenéticos (MN y ANE). Se extrajeron sedimentos de dos charcos en un sitio forestal (Ch2 y Ch6), y del control NF, a los 15, 30 y 90 días posteriores a la primera aplicación de agroquímicos (T1, T2 y T3, respectivamente), teniendo en cuenta sus tiempos de vida media. En los sedimentos de los sitios Ch2 y Ch6 se detectó la presencia de agroquímicos. Las larvas de *P. gracilis* fueron expuestas durante 43 días a los sedimentos en mesocosmos al aire libre. Cada tratamiento se preparó por triplicado y se colocaron 32 larvas en estado de desarrollo de Gosner 27 a 29 por acuario. Se extrajeron dos larvas/réplica cada semana para analizar malformaciones; así como tasas de desarrollo y crecimiento; y dos larvas/réplica a las 168 h para evaluar genotoxicidad. Se determinó el índice de condición corporal (BCI), para los metamorfos de cada tratamiento. Se encontraron diferencias significativas en la tasa de desarrollo de las larvas entre tratamientos ($H=11.02$; $p<0.05$); pero no se observaron diferencias en las tasas de crecimiento ($H=4.52$, $p=0.48$). Las frecuencias de MN y ENA en las larvas expuestas a los sedimentos de Ch2 y Ch6 fueron mayores que en las larvas expuestas a sedimentos de NF ($p<0.05$; test de proporción binomial). Las anomalías morfológicas

en larvas expuestas a los sedimentos de Ch2 y Ch6 también tuvieron una frecuencia mayor que las del grupo control ($p < 0.05$; test de proporción binomial). Los metamorfos de NF tuvieron un mejor estado energético que los del resto de los tratamientos ($p < 0.05$). Los resultados demuestran la toxicidad de los sedimentos de los sitios forestales y destacan la utilidad del abordaje experimental para estudiar los efectos de los contaminantes en un contexto ecológicamente relevante. En los capítulos 3 y 4, se evaluó la toxicidad aguda, la genotoxicidad, y los efectos subletales a nivel individual y celular, del herbicida Dual Gold® (DG®), a base de S-metolaclo-ro (SM), sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae), mediante bioensayos de exposición agudos y crónicos. Este herbicida persiste en los sedimentos y es uno de los más utilizados en el mundo. Las larvas fueron expuestas a cinco concentraciones nominales de DG® (5.0; 6.2; 7.8; 9.8; y 12.2 mg/L); y a un control negativo con agua de-clorada. El valor de concentración letal media=CL50_{24h} para DG® fue de 7.0 mg/L, la concentración sin efecto observado (NOEC)=5.0 mg/L y la concentración con efecto observado más baja (LOEC)=6.2 mg/L. Las larvas fueron sensibles al herbicida, alcanzando el 100% de mortalidad a las 24h, en la concentración más alta analizada (12.2 mg/L). Se determinó la frecuencia de MN y ENA en larvas expuestas a tres concentraciones de DG® (1.0, 5.0 y 6.2 mg/L), durante 48 y 96 h; y las mismas se compararon con un control positivo (40 mg/L de Ciclofosfamida (CP)) y negativo. Las frecuencias de MN y ANE en los eritrocitos de larvas expuestas a DG® y CP fueron significativamente mayores que en el grupo control negativo. Para evaluar los efectos subletales crónicos a nivel individual (crecimiento, desarrollo, y malformaciones) y celular (MN y ENA), las larvas (GS25) fueron expuestas durante 25 días a la NOEC; NOEC/5; y a un control negativo. La exposición crónica al DG® provocó un retraso en el crecimiento y desarrollo, la aparición de anomalías morfológicas, y un aumento en las frecuencias de MN y de ENA, confirmando su potencial genotóxico. Pese a que los efectos de la actividad forestal a escala de ensambles no fueron evidentes, pudimos comprobar que los agroquímicos asociados al manejo de la forestación producen efectos nocivos a nivel individual y a nivel citogenético en las larvas de anuros, representando un riesgo para los anfibios que se desarrollan en agroecosistemas. Los resultados destacan la necesidad de seguir profundizando en el conocimiento de los efectos tóxicos de los distintos agroquímicos sobre las primeras etapas de vida de los anfibios. Esta información es clave para poder mitigar los efectos de los contaminantes, y contribuir a la conservación de este grupo zoológico. *Leptodactylus luctator* podría ser un buen candidato para transformarse en un organismo modelo en la región para el biomonitorio porque tiene una amplia distribución en el bioma pampa, donde la actividad forestal ocupa un rol central.

PALABRAS CLAVES: Forestación; riqueza de especies; anfibios, agroquímicos, micronúcleos; biomarcadores; índice de condición corporal; anomalías nucleares de los eritrocitos; biodiversidad, conservación.

ABSTRACT

In Uruguay, forestry activity has grown in recent years, surpassing one million hectares. Monocultures lead to modifications in landscape structure, a reduction in environmental heterogeneity, and impacts on ecosystems associated with the use of agrochemicals. Pesticides and their metabolites are detected in soils and surface water bodies, where they can persist and cause adverse effects on aquatic organisms, such as anuran tadpoles. For this reason, and due to their high sensitivity, amphibians serve as a good biological model to study the effects of these contaminants. Few studies assess the impact of forestry activity on native amphibian assemblages. The aim of this thesis was to evaluate the potential effects of forestry activity on anuran amphibians in Uruguay at different levels of organization. In Chapter One, we analysed changes in the richness and composition of anuran assemblages associated with forestry activity. The impact of this activity on the body condition and blood cell parameters (presence of Micronuclei (MN) and other nuclear abnormalities in erythrocytes (ANE) of *Pseudis minuta* individuals was determined. Seasonal sampling was conducted on vocalizing males and tadpoles at two pine-forested sites (FA=active afforestation and FB=recently harvested area) and a control site (NF). Richness comparison among study sites was based on rarefaction curves, and a PERMANOVA was employed to assess differences in species composition. Richness and species composition between the control and forested sites were found to be similar. No differences were observed in the body condition of *P. minuta* individuals among the study sites. However, the frequency of MN+ANE in tadpoles from the forested site was significantly higher than in tadpoles from the control site. These results underscore the importance of evaluating potential effects of Pine forestry activity on amphibians at other organizational levels (e.g., cellular). In Chapter 2, we delved deeper into understanding the effects of forestry activity at both the individual and cellular levels in anurans. We assessed the toxicity of sediments from ponds in a forested site managed with agrochemicals, using *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) as a bioindicator species. Biological responses to contaminants were evaluated using morphological biomarkers (e.g., morphological anomalies) and cytogenetic biomarkers (MN and ANE). Sediments were collected from two ponds in a forested site (Ch2 and Ch6) and the NF control site, at 15, 30, and 90 days after the initial agrochemical application (T1, T2, and T3, respectively), considering their half-lives. The presence of agrochemicals was detected in the sediments from Ch2 and Ch6. *P. gracilis* tadpoles were exposed to the sediments for 43 days in outdoor mesocosms. Each treatment was prepared in triplicate, with 32 tadpoles placed in each aquarium (GS 27-29). Two tadpoles per replicate were extracted weekly to analyze malformations, as well as development and growth rates. Additionally, two tadpoles per replicate were extracted at 168 hours to assess genotoxicity. The body condition index (BCI) was determined for the metamorphs in each treatment. Significant differences were found in the larval development rate among treatments ($H=11.02$; $p<0.05$), but no differences were observed in growth rates ($H=4.52$, $p=0.48$). Frequencies of MN and ANE in tadpoles exposed to sediments from Ch2 and Ch6 were higher than in tadpoles exposed to NF sediments ($p<0.05$; binomial proportion test). Morphological anomalies in tadpoles exposed to the former also had a higher frequency than the control group ($p<0.05$; binomial proportion test). Metamorphs from NF exhibited better energetic status than those from other treatments ($p<0.05$). The results demonstrate the toxicity of sediments from forested sites and underscore the utility of

the experimental approach for studying contaminant effects in an ecologically relevant context. In chapters 3 and 4, the acute toxicity, genotoxicity, and sublethal effects at both individual and cellular levels of the herbicide Dual Gold® (DG®), based on S-metolachlor (SM), were evaluated on *Leptodactylus luctator* tadpoles (Anura: Leptodactylidae) through acute and chronic exposure bioassays. This herbicide persists in sediments and is widely used worldwide. Tadpoles were exposed to five nominal concentrations of DG® (5.0; 6.2; 7.8; 9.8; and 12.2 mg/L) and a negative control with dechlorinated water. The median lethal concentration (LC50) for DG® was 7.0 mg/L, the no observed effect concentration (NOEC) was 5.0 mg/L, and the lowest observed effect concentration (LOEC) was 6.2 mg/L. The tadpoles were sensitive to the herbicide, reaching 100% mortality at 24h in the highest tested concentration (12.2 mg/L). The frequency of micronuclei (MN) and nuclear abnormalities (ENA) was determined in tadpoles exposed to three DG® concentrations (1.0, 5.0, and 6.2 mg/L) for 48 and 96 h, compared with a positive control (40 mg/L Cyclophosphamide (CP)) and a negative control. MN and ENA frequencies in DG® and CP-exposed tadpoles were significantly higher than in the negative control group. To assess chronic sublethal effects at both individual (growth, development, and malformations) and cellular (MN and ENA) levels, tadpoles (GS25) were exposed for 25 days to the NOEC, NOEC/5, and a negative control. Chronic exposure to DG® caused growth and development delays, the appearance of morphological anomalies, and increased frequencies of MN and ENA, confirming its genotoxic potential. Although the effects of forestry activity at the assemblage scale were not evident, we found that agrochemicals associated with forestry management produce harmful effects at the individual and cytogenetic levels in anuran tadpoles, posing a risk to amphibians in agroecosystems. The results emphasize the need for further investigation into the toxic effects of various agrochemicals on the early life stages of amphibians. This information is crucial for mitigating the effects of pollutants and contributing to the conservation of this zoological group. *Leptodactylus luctator* could be a suitable candidate for becoming a model organism in the region for biomonitoring because of its wide distribution in the Pampa biome, where Forest activity plays a central role.

KEYWORDS: Afforestation; species richness; amphibians; agrochemicals; micronuclei; biomarkers; body condition index; erythrocyte nuclear abnormalities, biodiversity, conservation.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Intensificación agrícola y sus efectos

En los últimos años, la actividad agrícola se ha intensificado y extendido notablemente en América del Sur (Paruelo *et al.*, 2006; Graesser *et al.*, 2018; Baeza & Paruelo, 2020). Este fenómeno es consecuencia principalmente de la incorporación de un nuevo paquete tecnológico que incluye la siembra directa, el uso de semillas transgénicas y un incremento en la aplicación de agroquímicos (AQ) como plaguicidas y fertilizantes (Lajmanovich *et al.*, 2012). Según la FAO (2024) (Food and Agricultural Organization), todos los años, las plagas de las plantas causan la pérdida de hasta un 40% de los cultivos alimentarios en todo el mundo, razón por la cual el uso de plaguicidas se intensifica a fin de incrementar el rendimiento de los cultivos. El aumento en el uso de AQ también puede ser consecuencia de la aplicación continúa de las mismas formulaciones comerciales, que conducen a la aparición de resistencias en los organismos blanco (Coalova *et al.*, 2012), lo cual puede derivar en un aumento en la dosis y cantidad de aplicaciones. Dentro de las principales consecuencias del incremento en la utilización de AQ se encuentra el impacto negativo que estos pueden tener sobre el ambiente. Generalmente solo un 0.1% de la cantidad de plaguicida aplicada llega a la plaga, mientras que el resto circula en el ambiente, actuando como fuente de contaminación emergente para el suelo, el agua, y la biota (Carvalho *et al.*, 1998). En este sentido, distintos AQ utilizados en la agricultura y sus metabolitos son frecuentemente detectados contaminando suelos y cuerpos de agua superficiales (Gilliom *et al.*, 2006; De Liguoro *et al.*, 2014; Nardo *et al.*, 2015; Soutullo *et al.*, 2020); a donde suelen llegar por escorrentía (Martino *et al.*, 2008). Además, varios productos químicos tienden a persistir en el agua, e incluso, a acumularse en los sedimentos, donde pueden provocar toxicidad para organismos acuáticos no blanco (Fojut *et al.*, 2013; Zhelev *et al.*, 2018); motivo por el cual el problema de la contaminación del agua adquiere una nueva dimensión (Lajmanovich & Peltzer, 2008). Los mayores niveles de contaminantes se observan en las capas más superficiales de sedimentos donde se concentra la materia orgánica (Hoffman *et al.*, 2003). El destino final y la persistencia de los plaguicidas en el ambiente es complejo y depende de varios factores que están interrelacionados, entre los que se destacan las condiciones ambientales, las características propias de los compuestos, así como del sitio contaminado y el suelo (Tellechea *et al.*, 2007).

Además de los efectos adversos asociados al uso de AQ, las actividades agrícolas, como la silvicultura a gran escala, provocan modificaciones en la estructura del paisaje y una reducción en la heterogeneidad ambiental, lo cual puede repercutir negativamente sobre la diversidad de la herpetofauna (Parris & Lindenmayer, 2004; Machado *et al.* 2012; Gainsbury & Colli, 2014; Saccol *et al.*, 2017; Allingham, 2020). Adicionalmente, los monocultivos forestales generan otros impactos en los ecosistemas

que pueden afectar de forma directa o indirecta a la biota; como por ejemplo: reducción en el rendimiento hidrológico, deterioro de la calidad del agua y del suelo, modificación en el ciclo de nutrientes, variaciones fisicoquímicas a nivel del suelo (ej. caída del pH) (Le Maitre *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2002; Noretto *et al.*, 2005; Jobbágy *et al.*, 2006); así como un incremento en el sombreado (Means *et al.*, 1996; Parris & Lindenmayer, 2004; Machado *et al.*, 2012), entre otros. Se ha demostrado que la forestación con pinos genera varios impactos sobre los ecosistemas naturales a causa de su gran potencial de invasión (Machado *et al.*, 2012; Zalba *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 1994; Bustamante & Simonetti, 2005). Cabe destacar que el efecto de la forestación no sólo se percibe como la transformación de la estructura del ambiente durante el periodo de plantación, sino también en la etapa postcosecha (Knapp *et al.*, 2003).

Situación en Uruguay

En Uruguay, al igual que en el resto de América del Sur, uno de los principales cambios en el uso del suelo es la transformación de grandes áreas de pastizales naturales en monocultivos forestales (Noretto, *et al.*, 2005; Fonseca *et al.* 2009; Veldman *et al.* 2015; Baeza & Paruelo, 2020). En las últimas décadas se ha registrado una importante expansión de las plantaciones de árboles exóticos de rápido crecimiento (principalmente eucaliptus y pino), destinadas a la producción de madera y celulosa, superando actualmente el millón de hectáreas (MGAP-DGF, 2021). Como consecuencia de la actividad agrícola y forestal, entre el período comprendido entre los años 1985 y 2022, se perdieron 2 millones de hectáreas (16.8%) de pastizales naturales del país (Proyecto Mapbiomas Pampa Trinacional, 2023). Las plantaciones de árboles del género *Pinus* (con predominio de las especies *P. elliottii* y *P. taeda*), ocupan el 14.2% del área total forestada en Uruguay, y se concentran principalmente en los departamentos de Rivera, Tacuarembó, Cerro Largo y Treinta y tres (MGAP-DGF, 2021). Por otra parte, las plantaciones de árboles del género *Eucalyptus* son más representativas en el país, ocupando un 54,7% del área total forestada, con predominio de las especies *E. grandis* y *E. dunnii*, que se concentran principalmente en los departamentos de Río Negro, Rivera, Cerro Largo y Paysandú (MGAP-DGF, 2021). El crecimiento de la forestación se inició en la década de los 90, impulsado por la ley N°15.939 que establecía importantes beneficios tributarios para bosques implantados en zonas de prioridad forestal. Acompañando esta expansión en la actividad forestal, se destaca un incremento importante en la importación y consumo de AQ, que pasó de 1.762 toneladas en 1990 a una media de 13.000 toneladas anuales entre el 2015-2019 (Cárcamo, 2020).

El conocimiento acerca de los efectos directos de los AQ sobre el ambiente, la salud humana y animal, ha comenzado a manifestarse recientemente en Uruguay. Sin embargo, algunos estudios ya han revelado una vinculación parcial entre el deterioro de la calidad del agua en ecosistemas de agua dulce con el uso de agroquímicos (Kruk *et al.*, 2013), así como la presencia de herbicidas tanto en agua como en sedimentos

(Eguren *et al.*, 2008; Cantou *et al.*, 2010; Nardo *et al.*, 2015) y efectos de insecticidas sobre animales (Leites Cartagena, 2009; Ríos *et al.*, 2010; Colombo *et al.*, 2011). Pese a que la silvicultura continúa expandiéndose en el país, son escasos los estudios que evalúan el efecto de esta actividad sobre los anfibios autóctonos (ej. Maneyro & Carreira, 2023). La expansión de la silvicultura acentúa la necesidad de realizar estudios para poder comprender los efectos potenciales que esta actividad puede tener sobre la biota.

Los anfibios y su potencial como bioindicadores

Los anfibios son los vertebrados más amenazados a nivel mundial, con más del 40% de las especies en peligro de extinción (IUCN, 2023; Luedtke *et al.*, 2023). Según la última lista roja de los anfibios y reptiles del Uruguay, de las 49 especies de anfibios evaluadas, doce se encuentran en alguna categoría de amenaza, mientras que cuatro se consideran “casi amenazadas” (Carreira & Maneyro, 2015). Dentro de las principales amenazas para este grupo, tanto a nivel global como local, se destaca la pérdida y degradación del hábitat provocada principalmente por la actividad agrícola (Collins *et al.*, 2009; Carreira & Maneyro, 2019; IUCN, 2023, Luedtke *et al.*, 2023). Los anfibios son muy sensibles a la degradación del ambiente debido a varias de sus características biológicas y fisiológicas (Wells, 2007). La mayoría de las especies de la región presentan un ciclo de vida doble, con una fase larval acuática y una etapa adulta terrestre. Esto los posiciona como un grupo ideal para detectar variaciones en los ecosistemas, ya que están expuestos a alteraciones tanto en el medio acuático (receptor de contaminación) como en el terrestre, y responden a los cambios en las condiciones ambientales en ambos ecosistemas (Stebbins & Cohen, 1995; Cushman, 2006; Becker *et al.*, 2007). También poseen una piel delgada y permeable, que propicia la entrada de diversas sustancias tóxicas que pueden estar disueltas en el agua, y presentan una alta tasa de bioacumulación comparada con otros animales de su misma posición trófica (Unrine *et al.*, 2007). Además, son animales que en general presentan una baja capacidad de dispersión y una alta fidelidad de sitio (Smith & Green, 2005; Caldwell & Shepard, 2007), siendo particularmente vulnerables a las alteraciones a nivel del paisaje (Cushman 2006; Cayuela *et al.*, 2015).

Cabe destacar que los anfibios cumplen con las principales características que debe poseer un indicador biológico, entre las cuales se destacan: ser ubicuos, abundantes, fácilmente detectables, de fácil muestreo, y relativamente sedentarios, entre otras cosas (Metcalf, 1989). Por estas características y por su alta sensibilidad son utilizados como bioindicadores de calidad ambiental, para abordar los efectos de la degradación del hábitat (i.e. Eterovick *et al.*, 2016; Saccol *et al.*, 2017; Bionda *et al.*, 2018).

Los anfibios en estudios de ecotoxicología

Según Carriquiriborde (2021), la ecotoxicología se define como una “*disciplina científica aplicada que tiene por objeto comprender y predecir la distribución, destino y efectos, directos e indirectos, causados por agentes contaminantes de naturaleza física, química (de origen natural o sintético) o biológica que, producto de la acción antrópica, alcanzan en el ambiente niveles anormales alterando la estructura y/o función de los ecosistemas, con el fin de proveer herramientas de gestión que permitan prevenir, mitigar o remediar tales efectos*”. El autor destaca que la disciplina trata de comprender los efectos indirectos de los contaminantes, lo cual es muy importante ya que estos suelen actuar en primera instancia a nivel molecular generando una cascada de efectos que pueden manifestarse a niveles superiores de organización como el nivel de comunidad (ej. pérdida de una especie clave en el ecosistema). Además, resalta el carácter práctico de la Ecotoxicología, ya que el conocimiento generado se puede aplicar para resolver problemas concretos que se han encontrado. Por ser considerados buenos indicadores biológicos tanto para monitoreo en campo como para evaluaciones de laboratorio, el estudio de los anfibios en el marco de investigaciones ecotoxicológicas ha adquirido un especial interés. Además, la implicancia que tiene la expansión de la agricultura y la contaminación ambiental sobre su declinación poblacional (Luedtke *et al.*, 2023); puede haber impulsado este tipo de investigaciones.

Como consecuencia de lo expuesto anteriormente, durante los últimos años se ha registrado un incremento de los estudios que utilizan a los anfibios como modelos experimentales, con el objetivo de identificar y caracterizar el peligro potencial y los mecanismos de acción de los plaguicidas asociados a la actividad agrícola (i.e. Paganelli *et al.*, 2010; Peltzer *et al.*, 2013a; Attademo *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2019; Pavan *et al.*, 2021). Los efectos de estos contaminantes químicos pueden evaluarse tanto en los estadios acuáticos como en los terrestres, pudiendo afectar a los individuos directamente (por ej. reduciendo las tasas de crecimiento y desarrollo) o indirectamente, mediante la alteración de sus interacciones con otros organismos (Hanlon & Relyea, 2013). Si bien los animales en estadios posmetamórficos pueden servir como modelos para el estudio del efecto de algunos contaminantes químicos (Mann & Bidwell, 1999; Relyea, 2005), la fase larval es la más utilizada en los estudios ecotoxicológicos, ya que existe evidencia de que son más sensibles que los adultos frente a los cambios ambientales (Clements *et al.*, 1997; Hopkins, 2007). Además, el número de individuos obtenidos por muestreo es alto, y las larvas pueden mantenerse con mayor facilidad en condiciones experimentales (Lajmanovich *et al.*, 2021).

Abordajes experimentales

Con el objetivo de evaluar los efectos perjudiciales de agentes químicos sobre organismos vivos, se debe establecer una relación cuantitativa y reproducible entre la

exposición a dichos agentes y alguna medida de daño a los organismos expuestos (Peluso & Carriquiriborde, 2021). Para esto se utilizan los ensayos de toxicidad biológica o bioensayos. Un bioensayo de toxicidad es una prueba controlada y reproducible, que permite medir los efectos específicos de un agente tóxico sobre un organismo vivo expuesto (adaptado a condiciones de laboratorio) (Lewis, 1998). Estos efectos específicos cuantificables se conocen como variables de respuesta o puntos finales biológicos. Además, estos ensayos permiten determinar la relación entre la exposición química y el grado de respuesta tóxica, es decir, la relación dosis/respuesta. En estudios ecotoxicológicos con larvas de anfibios, son comunes los bioensayos de exposición de larvas a diferentes concentraciones del químico a estudiar, durante un tiempo previamente establecido, por lo cual, las respuestas biológicas se relacionan con la concentración y con el tiempo de exposición (relación concentración/respuesta) (Ej. Lajmanovich *et al.*, 2015b; 2022; Sansiñena, 2020). Cabe mencionar que, a partir de este tipo de bioensayos, se pueden determinar parámetros toxicológicos importantes que permiten comparar el grado de toxicidad de un compuesto; la sensibilidad de diferentes especies; así como las diferentes condiciones experimentales para la misma especie (Peluso & Carriquiriborde, 2021). Dentro de estos parámetros se destacan la concentración letal media (CL₅₀), que es la concentración que resulta letal para el 50% de los organismos de prueba durante el período de exposición; la concentración sin efecto observado (NOEC), que es la concentración más alta que no muestra una diferencia significativa en el efecto adverso en comparación con el control; y la concentración con el efecto observado más bajo (LOEC), que es la concentración más baja con diferencias significativas en el efecto adverso en comparación con el control (USEPA, 1996; Newman, 2014).

En función del tiempo de exposición de los organismos de prueba, los ensayos de toxicidad pueden ser agudos o crónicos (USEPA, 1975; 1996). Los ensayos agudos son pruebas de corta duración (típicamente duran de 24 a 96 h) (USEPA, 1975), y permiten medir efectos agudos que suelen ser bastante severos en los organismos de prueba (Peluso & Carriquiriborde, 2021). En cambio, los ensayos crónicos evalúan los efectos de agentes tóxicos en una parte significativa del ciclo de vida del organismo de prueba (el 10% o más del ciclo). Esta exposición más prolongada a niveles bajos de tóxicos permite evaluar efectos subletales a largo plazo en el crecimiento, comportamiento y reproducción; mediante alteraciones bioquímicas y fisiológicas en los organismos de prueba (USEPA, 1996).

Como se mencionó anteriormente, los distintos AQ utilizados en la actividad agrícola, pueden llegar a los cuerpos de agua y acumularse en los sedimentos. Esto puede afectar a las larvas de anfibios que allí se desarrollan, especialmente a las especies con hábitos bentónicos, que están en contacto más estrecho con el sedimento, ya que se alimentan en o cerca del fondo de los cuerpos de agua (McDiarmid & Altig,

1999). Existen pruebas de toxicidad de sedimentos estandarizadas para anfibios, que resultan claves para evaluar si los contaminantes químicos en los sedimentos representan un riesgo para estos organismos (USEPA 1996; ASTM, 2022). Los experimentos de mesocosmos al aire libre han resultado ser efectivos para estudiar la toxicidad de sedimentos sobre larvas de anuros (Peltzer *et al.*, 2013a; Sansiñena *et al.*, 2018). Los mesocosmos ofrecen condiciones ecológicas más realistas, considerándose un nivel intermedio entre los ensayos de laboratorio y de campo, ya que minimizan los riesgos de simplificar en exceso el entorno; y de las grandes variaciones entre réplicas (Boone & James, 2005). Su principal ventaja es que permiten estudiar los efectos de los contaminantes en un contexto ecológicamente relevante (Boone & James, 2005). No obstante, los estudios que involucran el uso de sedimentos contaminados para evaluar sus potenciales efectos sobre larvas de anuros en la región son escasos (Peltzer *et al.*, 2013a; Henao Muñoz *et al.*, 2015; Curi *et al.*, 2017; Gripp *et al.*, 2017; Sansiñena *et al.*, 2018).

Uso de biomarcadores.

Muchas veces los agroquímicos tienen baja persistencia ambiental, o están en bajas concentraciones, y son difíciles de cuantificar. En estos casos resulta útil el uso de biomarcadores de respuesta o efecto tóxico, para detectar su presencia en el ambiente y sus consecuencias biológicas (Lajmanovich *et al.*, 2012; 2021). Los biomarcadores son las diversas respuestas biológicas o cambios que pueden medirse a distintos niveles (ej. bioquímico, fisiológico, morfológico, histológico, etológico) en sistemas biológicos en respuesta a xenobióticos o estresores ambientales (Gupta, 2014). Existen distintos tipos de biomarcadores en función del nivel de organización del parámetro a estudiar. Los biomarcadores genéticos reflejan daños en el material genético, y entre estos se destacan los Micronúcleos (MN), y las Aberraciones Nucleares (ANE) en los eritrocitos (Ej. núcleos lobulados, con muescas, células binucleadas, anucleadas, etc.) (Cavas & Ergene-Gözükara, 2005; Lajmanovich *et al.*, 2005; Benvindo-Souza *et al.*, 2020). Es importante destacar que en los anfibios los eritrocitos son nucleados (Duellman & Trueb, 1994); y por este motivo es posible visualizar diferentes alteraciones a nivel del núcleo en sus glóbulos rojos, como los MN y las ANE. Las evaluaciones de genotoxicidad se realizan principalmente a través del Test de MN que permite detectar los eritrocitos micronucleados en sangre periférica (Schmidt, 1975). Los MN son cuerpos citoplasmáticos, morfológicamente idénticos al núcleo principal pero más pequeños (diámetro inferior a 1/3 del núcleo principal), con una intensidad de tinción similar al núcleo principal, y no se encuentran conectados ni superpuestos con éste (Fenech, 2000; Meintièrres *et al.*, 2001). Se originan a partir de cromosomas o fragmentos de cromosomas que durante la metafase mitótica no se integran al núcleo principal, como consecuencia de la fragmentación del ADN (origen clastogénico), o de

la alteración del aparato mitótico (origen aneugénico) (Schmidt, 1975; Lajmanovich *et al.*, 2012). Los MN y ANE reflejan daños en etapas iniciales de exposición y son señales de alerta temprana frente a impactos ambientales (Josende *et al.*, 2015), que pueden detectarse antes de causar daños a nivel de las poblaciones de anfibios (mayor relevancia ecológica). El incremento en las frecuencias de MN y ANE como respuesta a agentes genotóxicos, puede derivar en un aumento en la teratogénesis, tumores, y una disminución en la aptitud de la especie afectada (Peluso *et al.*, 2020). En larvas de anfibios, son crecientes las evaluaciones de genotoxicidad mediante el reconocimiento de MN y ANE (Benvindo-Souza *et al.*, 2020); y hay efectos genotóxicos comprobados para diferentes AQ a nivel mundial (ej. Feng *et al.*, 2004; Bouhafs *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009); y regional (i.e. Vera Candioti *et al.*, 2010; Lajmanovich *et al.*, 2014; Pérez-Iglesias *et al.*, 2020; Herek *et al.*, 2021; entre otros).

Otros biomarcadores muy utilizados en anfibios son los bioquímicos, los morfológicos y los etológicos (Lajmanovich *et al.*, 2021). Dentro de los bioquímicos, se destacan las alteraciones en la actividad enzimática. Por ejemplo, la enzima acetilcolinesterasa (AChE), es inhibida por compuestos organofosforados (Aldridge, 1953), evidenciando su presencia. La actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST), también se utiliza como un biomarcador (Attademo *et al.*, 2007), debido a su papel en el metabolismo de los pesticidas (Jokanovic, 2001). También existen enzimas como la catalasa, cuya actividad funciona como biomarcador de estrés oxidativo (Brodeur *et al.*, 2011). Se han demostrado relaciones significativas entre la actividad enzimática y la aplicación de pesticidas en anuros (Attademo *et al.*, 2011; 2014; Brodeur *et al.*, 2011; Lajmanovich *et al.*, 2011). Por otra parte, el uso de biomarcadores morfológicos (ej. longitud/masa corporal; tasa de crecimiento/desarrollo; presencia de anomalías morfológicas) en larvas de anuros; ha resultado útil para determinar los efectos a nivel individual provocados por diversos agroquímicos (i.e. Peltzer *et al.*, 2013; Pérez-Iglesias *et al.*, 2015; 2020; Babini *et al.*, 2016; Natale *et al.*, 2018; Curi *et al.*, 2019; Barreto *et al.*, 2020). Finalmente, entre los biomarcadores etológicos más utilizados en estudios ecotoxicológicos con larvas de anuros, se destacan las alteraciones en la actividad de nado (i.e. Pérez-Iglesias *et al.*, 2019; Rutkoski *et al.*, 2020; Pavan *et al.*, 2021). Cabe destacar que, para lograr un análisis más robusto, fiable e integrado sobre la acción de los contaminantes, es recomendable la utilización de varios tipos de biomarcadores (Pollo *et al.*, 2015; Lajmanovich *et al.*, 2021).

Efectos de la forestación y del uso de agroquímicos sobre los anfibios: antecedentes.

Las plantaciones forestales pueden generar efectos perjudiciales sobre los anfibios (Means *et al.*, 1996). La riqueza de este grupo depende de la heterogeneidad ambiental, y varios estudios han demostrado que ambientes complejos, que proporcionan más variedad de microhábitats poseen una mayor riqueza de especies de

anfibios en relación con los ambientes homogéneos (ej. Afonso & Eterovick, 2007; Bastazini *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2019). Existen además otros factores importantes que influyen en la riqueza de anfibios como la presencia de depredadores (Eterovick & Barata, 2006; Kopp *et al.*, 2006), el nivel de perturbación (Morand & Joly, 1995), la matriz ambiental (Guerry & Hunter, 2002; Mazerolle *et al.*, 2005), así como las características físicas y la dinámica de los charcos (Bastazini *et al.*, 2007; Both *et al.*, 2009; Prado & Rossa-Feres, 2014). Cabe mencionar que se ha documentado que los efectos provocados por las plantaciones forestales sobre los anuros pueden ser más sutiles que un cambio en la riqueza o composición de especies, afectando por ejemplo al estado energético de los individuos (Maneyro & Carreira, 2023). En la región hay un interés creciente en estudios que involucren el efecto de la actividad agrícola sobre los ensambles de anfibios. En Argentina se han detectado disminuciones poblacionales (Peltzer *et al.*, 2005), así como variaciones en la composición de ensambles de anfibios en áreas agrícolas (Peltzer *et al.*, 2003, 2004; Peltzer, 2006). Además, existe evidencia de que los monocultivos de *Pinus spp.* reducen la riqueza de anfibios anuros y producen cambios en la composición en la región (Machado *et al.*, 2012; Gangenova *et al.*, 2018). A pesar de la tendencia a la disminución de la densidad y diversidad de anfibios observada en áreas muy perturbadas (Davidson, 2004); muchas especies han sido capaces de persistir en paisajes agrícolas en todo el mundo explotando los recursos disponibles en estos sitios.

En relación con los agroquímicos, la mayor parte de los plaguicidas son tóxicos para los anfibios, y además muchos de ellos son de carácter bioacumulativo, por lo cual sus efectos pueden no ser vistos a corto plazo, pero pueden aparecer luego de un tiempo (Montori *et al.*, 2007). Los anfibios tienen una alta probabilidad de entrar en contacto con estas sustancias ya que habitan cuerpos de agua que pueden estar asociados o inmersos en sistemas agrícolas (García-Muñoz *et al.*, 2010). Diversos estudios revelaron la implicancia de los anfibios en el control biológico de plagas dentro de cultivos de soja, situación que los expone directamente a los plaguicidas y los convierte en buenos modelos de estudio para ver sus efectos en el campo (Attademo *et al.*, 2005; Peltzer *et al.*, 2010). A pesar de que, en altas dosis, los AQ pueden causar la muerte de los individuos, en general, estos provocan efectos subletales crónicos que pueden comprometer indirectamente la sobrevivencia. Por ejemplo, pueden generar alteraciones en las tasas de crecimiento y desarrollo de las larvas (Hayes *et al.*, 2006; Quintaneiro *et al.*, 2018; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019); pueden propiciar la aparición de malformaciones en los individuos (Ouellet *et al.*, 1997; Bach *et al.*, 2016; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022); y también pueden facilitar la parasitosis mediante mecanismos de inmunosupresión (Kiesecker, 2002; Johnson *et al.*, 2008). Adicionalmente, los tratamientos con plaguicidas eliminan gran parte de los invertebrados que constituyen la dieta de anfibios, lo que significa una pérdida de

disponibilidad trófica (Montori *et al.*, 2007). Los fertilizantes, también pueden tener impactos negativos, ya que los distintos compuestos nitrogenados, aumentan la tasa de mortalidad de larvas y modifican su comportamiento (por ej. disminuye la capacidad de natación, se incrementa la tasa de malformaciones, etc.) (Marco *et al.*, 1999). También pueden provocar un enlentecimiento en la metamorfosis y como consecuencia del mismo, una prolongación del período larvario (de Wijer *et al.*, 2003), que puede afectar la probabilidad de sobrevivencia de los individuos.

A nivel regional diversos estudios evaluaron los efectos de agroquímicos como insecticidas (Lajmanovich *et al.*, 2009; Rutkoski *et al.*, 2020; Samojeden *et al.*, 2022); herbicidas (Lajmanovich *et al.*, 2011; Peltzer *et al.*, 2013b; Pérez-Iglesias *et al.*, 2015); e incluso de mezclas de estos compuestos (Soloneski *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2019; Pavan *et al.*, 2021; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022), sobre distintos puntos finales biológicos en larvas de anuros. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los estudios que involucren el uso de sedimentos contaminados para evaluar los efectos sobre larvas de anuros a nivel del bioma pampa aún son escasos.

Las especies de estudio: *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892); *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883); y *Pseudis minuta* (Günther, 1859).

La especie *Leptodactylus luctator* (Figura 1 C y D), conocida comúnmente como “Rana común”, pertenece a la familia Leptodactylidae. Presenta una amplia distribución en el cono sur Sudamericano (Magalhães *et al.*, 2020) y en Uruguay se encuentra en todo el territorio (Maneyro & Carreira, 2012). Posee un amplio uso del hábitat; y puede encontrarse en zonas de campo natural, así como en ambientes afectados por la actividad agrícola y forestal (Maneyro & Carreira, 2012). Se reproduce en cuerpos de agua lénticos permanentes o estacionales; durante los meses de agosto a marzo. Los huevos son depositados en nidos de espuma que son protegidos por la hembra del ataque de depredadores. En general la metamorfosis ocurre en 60 días, y las larvas presentan comportamiento gregario formando cardúmenes que también son vigilados por la hembra hasta que se completa la etapa de desarrollo larval (Vaz-Ferreira & Gerhau, 1975). Las larvas tienen hábitos bentónicos y su fórmula dentaria es 2/3 (Santos, 2022). Es considerada una especie muy común y no se encuentra en ninguna categoría de amenaza en las listas rojas regionales (i.e. Carreira & Maneyro, 2015) ni a escala global (Heyer *et al.*, 2010). Algunos trabajos previos han utilizado a esta especie como organismo de prueba en estudios toxicológicos (Araujo *et al.*, 2014; Josende *et al.*, 2015; Lajmanovich *et al.*, 2015b; Bach *et al.*, 2016; Bach *et al.*, 2018; Samojeden *et al.*, 2022).

Physalaemus gracilis (Anura: Leptodactylidae) (Figura 1 A y B), se encuentra presente en Brasil (estados de Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul), Argentina (provincia de Misiones), y en gran parte del territorio uruguayo (principalmente al sur

del Río Negro) (Maneyro & Carreira, 2012). En Uruguay ocupa diversos ambientes como praderas, bañados, y se caracteriza por coexistir con relativo éxito con la urbanización (Maneyro & Carreira, 2012). Se reproduce en los meses cálidos, principalmente en cuerpos de agua lénticos con mucha vegetación flotante; y los huevos son depositados en nidos de espuma (Maneyro & Carreira, 2012). Las larvas presentan hábitos bentónicos; y su fórmula dentaria es: 2(2) /3(1) (Santos, 2022). Es una especie que no se encuentra amenazada a nivel local (Carreira & Maneyro, 2015), ni global (Lavilla *et al.*, 2010). Trabajos previos han utilizado a *P. gracilis* como organismo de prueba en estudios ecotoxicológicos (ej. Vanzetto *et al.*, 2019; Herek *et al.*, 2020; 2021; Rutkoski *et al.*, 2020; 2021).

La especie *Pseudis minuta* (Figura 1 E y F), también conocida como rana boyadora grande, es acuática, de tamaño mediano y pertenece a la familia Hylidae. Se encuentra ampliamente distribuida en el Bioma Pampa y es muy frecuente en todo el territorio uruguayo, donde habita zonas naturales y ambientes antropizados (Maneyro & Carreira, 2012). Presenta adaptaciones para la vida en el agua como los ojos en posición dorsal, y una membrana interdigital muy desarrollada en las patas posteriores para el nado. Su reproducción ocurre principalmente en los meses cálidos, en cuerpos de agua lénticos y permanentes; y las puestas se adhieren a la vegetación acuática (Maneyro & Carreira, 2012). Las larvas tienen un desarrollo lento, nado muy activo, presentan hábitos nectónicos, y su fórmula dentaria es 2(2) /3(1) (Santos, 2022). Es una especie que no se encuentra amenazada en Uruguay (Carreira & Maneyro, 2015), ni a nivel global (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2023).

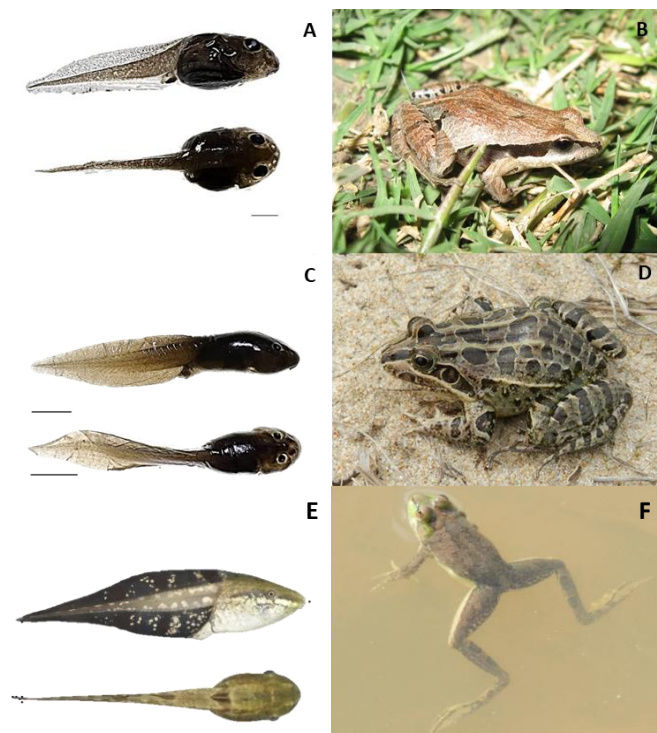


Figura 1. Especies de estudio. A. Larva de *Physalaemus gracilis* (vista lateral y dorsal); B. Adulto de *P. gracilis* (Foto: Raúl Maneyro); C. Larva de *Leptodactylus luctator* (vista lateral y dorsal); D. Adulto de *L. luctator* (Foto: Ernesto Elgue); E. Larva de *Pseudis minuta* (vista lateral y dorsal) (Foto: Brena da Silva Goncalvez); F. Adulto de *P. minuta* (Foto: Ernesto Elgue). Las barras negras representan una escala de 5 mm.

Presentación de la Tesis

La presente Tesis de Doctorado se titula: "**Anfibios en agroecosistemas forestales del Uruguay: una herramienta para el biomonitoreo**"; y se encuentra estructurada en cuatro capítulos. El objetivo general de la Tesis es evaluar los potenciales efectos de la actividad forestal sobre anfibios anuros del Uruguay, a diferentes niveles de organización. En el capítulo 1: "**Efectos de la actividad forestal sobre los ensambles de anfibios anuros en el departamento de Treinta y Tres, Uruguay**", se evaluaron los efectos de la actividad forestal con *Pinus* sobre anfibios anuros, en el departamento de Treinta y Tres, Uruguay. Se analizaron los cambios en riqueza y composición de los ensambles entre sitios afectados por la forestación y un sitio control dentro del Paisaje protegido Quebrada de los Cuervos y Sierras del Yermal. Además, se determinó la incidencia de la actividad forestal sobre la condición corporal y los parámetros de las células sanguíneas de individuos de *Pseudis minuta* (Anura: Hylidae); una especie presente en todos los sitios de muestreo. En el capítulo 2: "**Toxicidad de sedimentos en charcos asociada a la aplicación de agroquímicos en un sitio forestal: su efecto sobre larvas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**"; se evaluó la potencial toxicidad de los sedimentos de cuerpos de agua presentes en un sitio forestal bajo manejo con agroquímicos, utilizando a *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae), como especie bioindicadora. Mediante la realización de experimentos de mesocosmos al aire libre, las larvas de *P. gracilis* fueron expuestas a distintos tratamientos con sedimentos provenientes del sitio forestal y de un sitio control. Se evaluaron las respuestas biológicas de las larvas a nivel individual (mortalidad, crecimiento, desarrollo, anormalidades morfológicas, condición corporal de metamorfos), y celular (presencia de Micronúcleos (MN) y otras aberraciones nucleares en eritrocitos (ANE)). En el capítulo 3: "**Toxicidad aguda y genotoxicidad del herbicida Dual Gold®, a base de S-metolaclopro sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae)**"; se estudió la letalidad y los efectos a nivel genotóxico del herbicida Dual Gold® (DG®) a base de S-metolaclopro (SM), sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae), mediante la realización de bioensayos de toxicidad aguda. Se determinó la CL₅₀ del herbicida a las 24 h; así como la frecuencia de MN y ANE en larvas de *L. luctator* expuestas durante 96 h a distintas concentraciones de DG®. En el capítulo 4: "**Efectos subletales provocados por una formulación comercial de S-metolaclopro sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae), a diferentes niveles de organización**", se

evaluaron los efectos subletales a nivel individual y celular del herbicida DG[®], sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae), utilizando bioensayos de toxicidad crónicos (25 días de exposición). Finalmente se presentan las principales conclusiones generales derivadas de la Tesis y las perspectivas de trabajo; y se encuentran 4 anexos. En el anexo I se adjunta el trabajo titulado: “Effects of Forestry Activity on Anuran Amphibians: A Case Study in Uruguay”, aceptado para su publicación en el Libro: “Water, Pesticides, Organisms: Current Approach of Ecotoxicology” (Capítulo 18), Marília Hartmann, Paulo Afonso Hartmann, Caroline Müller, Aline Pompermaier (Eds). En el anexo II se adjunta el artículo titulado: “Acute toxicity and genotoxicity of the S-metolachlor-based herbicide Dual Gold[®] on *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892) tadpoles (Anura: Leptodactylidae)”; publicado en la revista Limnetica (Asociación Ibérica de Limnología), DOI: 10.23818/limn.43.19. En el Anexo III se presenta información de los sitios de estudio; y por último en el anexo IV se proporciona información del herbicida S-metolacoloro, utilizado en los bioensayos de exposición agudo y crónico.

BIBLIOGRAFÍA

- Afonso, L. G., & Eterovick, P. C. (2007). Spatial and temporal distribution of breeding anurans in streams in southeastern Brazil. *Journal of Natural History*, 41(13-16), 949-963.
- Aldridge, W. N. (1953). Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal*, 53(1), 110.
- Allingham, S. M. (2020). The effects of habitat alteration on anuran diversity and assemblages on Mount Mulanje, Malawi. *African Journal of Wildlife Research*, 50(1), 20-35.
- Araújo, C. V., Shinn, C., Moreira-Santos, M., Lopes, I., Espindola, E. L., & Ribeiro, R. (2014). Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles. *Aquatic toxicology*, 146, 70-75.
- ASTM, 2022. *Standard Guide for Conducting Whole Sediment Toxicity Tests with Amphibians*. E2591-22. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, Pennsylvania, USA.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., & Lajmanovich, R. C. (2005). Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, ecosystems & environment*, 106(4), 389-394.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna, M., & Fiorenza, G. (2007). Plasma B-esterase and glutathione S-transferase activity in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology*, 16, 533-539.
- Attademo, A. M., Cabagna-Zenklusen, M., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., 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(1), 274-282.

- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Junges, C. M., & Basso, A. (2014). Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 186, 635-649.
- Babini, M. S., Bionda, C. D. L., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2016). Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-14.
- Bach, N. C., Natale, G. S., Somoza, G. M., & Ronco, A. E. (2016). Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 23959-23971.
- Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (Amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297.
- Baeza, S., & Paruelo, J. M. (2020). Land use/land cover change (2000–2014) in the Rio de la Plata grasslands: an analysis based on MODIS NDVI time series. *Remote sensing*, 12(3), 381.
- Barreto, E., Salgado Costa, C., Demetrio, P., Lascano, C., Venturino, A., & Natale, G. S. (2020). Sensitivity of *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) tadpoles to environmentally relevant concentrations of Chlorpyrifos: effects at the individual and biochemical levels. *Environmental toxicology and chemistry*, 39(4), 834-841.
- Bastazini, C. V., Munduruca, J. F., Rocha, P. L. B., & Napoli, M. F. (2007). Which environmental variables better explain changes in anuran community composition? A case study in the restinga of Mata de São João, Bahia, Brazil. *Herpetologica*, 63(4), 459-471.
- Becker, C. G., Fonseca, C. R., Haddad, C. F. B., Batista, R. F., & Prado, P. I. (2007). Habitat split and the global decline of amphibians. *Science*, 318(5857), 1775-1777.
- Benvindo-Souza, M., Oliveira, E. A. S., Assis, R. A., Santos, C. G. A., Borges, R. E., e Silva, D. D. M., & de Souza Santos, L. R. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240, 124910.
- Bionda, C. D. L., Babini, S., Martino, A. L., Salas, N. E., & Lajmanovich, R. C. (2018). Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad *Rhinella arenarum* (anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation*, 14, e00398.
- Boone, M. D., and S. M. James. (2005). Use of aquatic and terrestrial mesocosms in ecotoxicology. *Applied Herpetology*, 2:231–257.
- Both, C., Solé, M., Dos Santos, T. G., & Cechin, S. Z. (2009). The role of spatial and temporal descriptors for neotropical tadpole communities in southern Brazil. *Hydrobiologia*, 624, 125-138.

- Bouhafs, N., Berrebbah, H., Devaux, A., Rouabhi, R., Djebbar, M.R., 2009. Micronucleus induction in erythrocytes of tadpoles *Rana saharica* (green frog of North Africa) exposed to Artea 330EC. *Am.-Eurasian J. Toxicol. Sci.* 1, 7–12.
- Brodeur, J. C., Suarez, R. P., Natale, G. S., Ronco, A. E., & Zaccagnini, M. E. (2011). Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1370-1380.
- Bustamante, R. O., & Simonetti, J. A. (2005). Is *Pinus radiata* invading the native vegetation in central Chile? Demographic responses in a fragmented forest. *Biological Invasions*, 7, 243-249.
- Caldwell, J. P., & Shepard, D. B. (2007). Calling site fidelity and call structure of a Neotropical toad, *Rhinella ocellata* (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 41(4), 611-621.
- Cantou, G., Roel, A., Carlomagno, M., & González-Sapienza, G. (2010). Disipación de los herbicidas clomazone y quinclorac en arroz bajo dos tratamientos de riego. En: *ARROZ Resultados Experimentales 2009-2010*. Capítulo 6: Valorización Sistema de Producción Arrocero. INIA. Actividades de Difusión 611.
- Cárcamo, M.I. (2020). Los Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAP) en Uruguay. *RAPAL-Uruguay*.
- Carreira, S. & Maneyro, R. (2015). *Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay*. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo.
- Carreira, S., & Maneyro, R. (Eds.). (2019). *Libro rojo de los anfibios y reptiles del Uruguay: biología y conservación de los anfibios y reptiles en peligro de extinción a nivel nacional*. MVOTMA, Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, Dirección Nacional de Medio Ambiente.
- Carriquiriborde, P. (2021). *Principios de Ecotoxicología*. Libros de Cátedra.
- Carvalho, F., Zhong, N., & Klaine, S. (1998). Rastreo de plaguicidas en los trópicos. *Boletín del OEIA*, 40, 24-30.
- Carvalho, W. F., Ruiz de Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J. M., Laborde, M. R., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2019). DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles. *Ecotoxicology*, 28, 367-377.
- Çavaş, T., & Ergene-Gözükara, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology*, 74(3), 264-271.
- Cayuela, H., Lambrey, J., Vacher, J. P., & Miaud, C. (2015). Highlighting the effects of land-use change on a threatened amphibian in a human-dominated landscape. *Population ecology*, 57, 433-443.
- Clements, C., Ralph, S., & Petras, M. (1997). Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental and molecular mutagenesis*, 29(3), 277-288.
- Coalova, I., Mencacci, S., & Fassiano, A. V. (2013). Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes? *Acta toxicológica argentina*, 21(1), 5-14.
- Collins, J. P., Crump, M. L., & Lovejoy III, T. E. (2009). *Extinction in our times: global amphibian decline*. Oxford University Press.

- Colombo, J. C., Cappelletti, N., Williamson, M., Migoya, M. C., Speranza, E., Sericano, J., & Muir, D. C. G. (2011). Risk ranking of multiple-POPs in detritivorous fish from the Río de la Plata. *Chemosphere*, 83(6), 882-889.
- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C., Attademo, M. A., Seib, S., Simoniello, M. F., & Lajmanovich, R. C. (2017). Altered development, oxidative stress and DNA damage in *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) larvae exposed to poultry litter. *Ecotoxicology and environmental safety*, 143, 62-71.
- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Sandoval, M. T., & Lajmanovich, R. C. (2019). Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2, 4-D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230, 1-15.
- Cushman, S. A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological conservation*, 128(2), 231-240.
- Cuzziol Boccioni, A. P., Lener, G., Peluso, J., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Aronzon, C., ... & Lajmanovich, R. C. (2022). Comparative assessment of individual and mixture chronic toxicity of glyphosate and glufosinate ammonium on amphibian tadpoles: A multibiomarker approach. *Chemosphere*, 309, 136554.
- Davidson, C. (2004). Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecological Applications*, 14(6), 1892-1902.
- De Liguoro, M., Bona, M. D., Gallina, G., Capolongo, F., Gallochio, F., Binato, G., & Di Leva, V. (2014). A monitoring of chemical contaminants in waters used for field irrigation and livestock watering in the Veneto region (Italy), using bioassays as a screening tool. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 3546-3557.
- deWijer, P., Watt, P. J., & Oldham, R. S. (2003). Amphibian decline and aquatic pollution: effects of nitrogenous fertiliser on survival and development of larvae of the frog *Rana temporaria*. *Applied Herpetology*, 1, 3-12.
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*. JHU press.
- Eguren, G., García, C., Rivas-Rivera, N., Bandeira, S., Vidal, N., Moura, M., ... & Böcking, B. (2008). Gestión ambiental de cuencas de uso agropecuario. *Revista Arroz*, 55, 10-20.
- Eterovick, P. C., & Barata, I. M. (2006). Distribution of tadpoles within and among Brazilian streams: the influence of predators, habitat size and heterogeneity. *Herpetologica*, 62(4), 365-377.
- Eterovick, P. C., Sloss, B. L., Scalzo, J. A., & Alford, R. A. (2016). Isolated frogs in a crowded world: Effects of human-caused habitat loss on frog heterozygosity and fluctuating asymmetry. *Biological Conservation*, 195, 52-59.
- FAO. (24 de mayo de 2024). Producción y protección vegetal. <https://www.fao.org/plant-production-protection/about/es>.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L., & Peng, P. (2004). Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere*, 56(5), 457-463.
- Figueiredo, G. D. T., Storti, L. F., Lourenco-De-Moraes, R., Shibatta, O. A., & ANJOS, L. D. (2019). Influence of microhabitat on the richness of anuran species: a case study of different landscapes in the Atlantic Forest of southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.

- Fojut, T. L., Vasquez, M. E., Poulsen, A. H., & Tjeerdema, R. S. (2013). Methods for deriving pesticide aquatic life criteria for sediments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 224, 97-175.
- Fonseca, C. R., Ganade, G., Baldissera, R., Becker, C. G., Boelter, C. R., Brescovit, A. D., ... & Vieira, E. M. (2009). Towards an ecologically-sustainable forestry in the Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 142(6), 1209-1219.
- Gainsbury, A. M., & Colli, G. R. (2014). Effects of abandoned Eucalyptus plantations on lizard communities in the Brazilian Cerrado. *Biodiversity and conservation*, 23, 3155-3170.
- Gangenova, E., Zurita, G. A., & Marangoni, F. (2018). Changes to anuran diversity following forest replacement by tree plantations in the southern Atlantic forest of Argentina. *Forest ecology and management*, 424, 529-535.
- García-Muñoz, E., Guerrero, F., Gilbert, J. D., & Parra, G. (2010). Paradoja del enriquecimiento agrícola. *Iniciación a la Investigación*, (5).
- Gilliom, R. J., Barbash, J. E., Crawford, C. G., Hamilton, P. A., Martin, J. D., Nakagaki, N., ... & Wolock, D. M. (2006). *Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992–2001* (No. 1291). US Geological Survey.
- Graesser, J., Ramankutty, N., & Coomes, O. T. (2018). Increasing expansion of large-scale crop production onto deforested land in sub-Andean South America. *Environmental Research Letters*, 13(8), 084021.
- Gripp, H. S., Freitas, J. S., Almeida, E. A., Bisinoti, M. C., & Moreira, A. B. (2017). Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 173-179.
- Guerry, A. D., & Hunter Jr, M. L. (2002). Amphibian distributions in a landscape of forests and agriculture: an examination of landscape composition and configuration. *Conservation Biology*, 16(3), 745-754.
- Gupta, R. C. (2014). Respiratory toxicity biomarkers. *Biomarkers in Toxicology*, 2014, 216-239.
- Hanlon, S. M., & Relyea, R. (2013). Sublethal effects of pesticides on predator–prey interactions in amphibians. *Copeia*, 2013(4), 691-698.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., ... & Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), 40-50.
- Henao Muñoz, L. M., Montes Rojas, C. M., & Bernal Bautista, M. H. (2015). Acute toxicity and sublethal effects of the mixture glyphosate (Roundup® Active) and Cosmo-Flux® 411F to anuran embryos and tadpoles of four Colombian species. *Revista de Biología Tropical*, 63(1), 223-233.
- Herek, J. S., Vargas, L., Trindade, S. A. R., Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. T. (2020). Can environmental concentrations of glyphosate affect survival and cause malformation in amphibians? Effects from a glyphosate-based herbicide on *Physalaemus cuvieri* and *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 22619-22630.

- Herek, J. S., Vargas, L., Trindade, S. A. R., Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. T. (2021). Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 81, 103516.
- Heyer, R., J. Langone, E. La Marca, C. Azevedo-Ramos, I. di Tada, D. Baldo, E. Lavilla, N. Scott, L. Aquino, J. Hardy. 2010. *Leptodactylus latrans*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T57151A11592655. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T57151A11592655.en>. Accessed on 23 February 2023.
- Hoffman, D.J., B.A. Rattner, G.A. Burton Jr. & J. Cairns Jr. (2003). Handbook of Ecotoxicology. 2nd ed. *Lewis Publishers CRC Press LLC: USA*. 1290 pp.
- Hopkins, W. A. (2007). Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR journal*, 48(3), 270-277.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2023. *Pseudis minuta*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2023: e.T55903A101426270. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T55903A101426270.en>. Accessed on 24 May 2024.
- IUCN 2023. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>.
- Jackson, R. B., Banner, J. L., Jobbágy, E. G., Pockman, W. T., & Wall, D. H. (2002). Ecosystem carbon loss with woody plant invasion of grasslands. *Nature*, 418(6898), 623-626.
- Jobbágy, E. G., Vasallo, M., Farley, K. A., Piñeiro, G., Garbulsky, M. F., Noretto, M. D., ... & Paruelo, J. M. (2006). Forestación en pastizales: hacia una visión integral de sus oportunidades y costos ecológicos. *Agrociencia Uruguay*, 10(2), 109-124.
- Johnson, P. T., Hartson, R. B., Larson, D. J., & Sutherland, D. R. (2008). Diversity and disease: community structure drives parasite transmission and host fitness. *Ecology letters*, 11(10), 1017-1026.
- Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(3), 139-160.
- Josende, M. E., Tozetti, A. M., Alalan, M. T., Mathies Filho, V., da Silva Ximenez, S., da Silva Júnior, F. M. R., & Martins, S. E. (2015). Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators*, 49, 83-87.
- Keller, A., Rödel, M. O., Linsenmair, K. E., & Grafe, T. U. (2009). The importance of environmental heterogeneity for species diversity and assemblage structure in Bornean stream frogs. *Journal of Animal Ecology*, 305-314.
- Kiesecker, J. M. (2002). Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9900-9904.
- Knapp, S. M., Haas, C. A., Harpole, D. N., & Kirkpatrick, R. L. (2003). Initial effects of clearcutting and alternative silvicultural practices on terrestrial salamander abundance. *Conservation Biology*, 17(3), 752-762.
- Kopp, K., Wachlewski, M., & Eterovick, P. C. (2006). Environmental complexity reduces tadpole predation by water bugs. *Canadian Journal of Zoology*, 84(1), 136-140.

- Kruk, C., Suárez, C., Ríos, M., Zaldúa, N., & Martino, D. (2013). Ficha: análisis calidad de agua en Uruguay. *Asesoramiento Ambiental Estratégico, Vida Silvestre, IUCN. Montevideo, Uruguay.*
- Lajmanovich, R. C., Cabagna, M., Peltzer, P. M., Stringhini, G. A., & Attademo, A. M. (2005). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1-2), 67-72.
- Lajmanovich, R. C., & Peltzer, P. M. (2008). Plan de monitoreo ambiental para el estudio del impacto de cultivos extensivos de arroz sobre el macrosistema Iberá. *Cátedra de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral-CONICET.*
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P., & Junges, C. M. (2009). Inhibition and recovery of cholinesterases in *Odontophrynus americanus* tadpoles exposed to fenitrothion. *Journal Of Environmental Biology*; 30; 5; 12-2009; 923-926.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Junges, C. M., & Cabagna, M. C. (2011). Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 60, 681-689.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Junges, C. M. (2012). Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Química Viva*, 11(3), 184-198.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Bassó, A., & Lorenzatti, E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 7-12.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Simoniello, M. F., Poletta, G. L., Junges, C. M., Peltzer, P. M., ... & Cabagna-Zenklusen, M. C. (2015) a. Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2, 4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, 1-12.
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Maglianese, M., ... & Beccaria, A. J. (2015) b. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. *Environmental Research*, 136, 205-212.
- Lajmanovich, R. C., Cuzziol Boccioni, A. P., Curi, L. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C., Bassó, A., Colussi, C., & Peltzer, P. M. (2021). Técnicas para el relevamiento de anfibios en ambientes contaminados. En: Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina. Pereyra, L., Etchepare, E., & Vaira, M; Editores. *Universidad Nacional de Jujuy. Ediunju*. Pp 326-347.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Lener, G., Boccioni, A. P. C., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., ... & Repetti, M. R. (2022). Glyphosate and glufosinate ammonium, herbicides

- commonly used on genetically modified crops, and their interaction with microplastics: Ecotoxicity in anuran tadpoles. *Science of The Total Environment*, 804, 150177.
- Lavilla, E., Kwet, A., Segalla, M. V., Langone, J., & Baldo, D. (2010). *Physalaemus gracilis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010:e.T57258A11610839. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T57258A11610839.en>. Accessed on 15 September 2023.
- Le Maitre, D. C., Versfeld, D. B., & Chapman, R. A. (2000). Impact of invading alien plants on surface water resources in South Africa: A preliminary assessment. *Water Research Commission*, 26(3), 397-408.
- Leites Cartagena, V. (2009). Estudios de fauna ictica en salto grande. *Comisión técnica mixta de salto grande. Jornadas de actualización, Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU)*.
- Lewis, R. A. (1998). *Lewis' dictionary of toxicology*. CRC press.
- Luedtke, J. A., Chanson, J., Neam, K., Hobin, L., Maciel, A. O., Catenazzi, A., ... & Stuart, S. N. (2023). Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature*, 1-7.
- Ma, Y., Li, B., Ke, Y., & Zhang, Y. (2019). Effects of low doses Trichlorfon exposure on *Rana chensinensis* tadpoles. *Environmental toxicology*, 34(1), 30-36.
- Machado, I. F., Moreira, L. F., & Maltchik, L. (2012). Effects of pine invasion on anurans assemblage in southern Brazil coastal ponds. *Amphibia-Reptilia*, 33(2), 227-237.
- Magalhães, F. D. M., Lyra, M. L., De Carvalho, T. R., Baldo, D., Brusquetti, F., Burella, P., ... & Garda, A. A. (2020). Taxonomic review of South American Butter Frogs: Phylogeny, geographic patterns, and species delimitation in the *Leptodactylus latrans* species group (Anura: Leptodactylidae). *Herpetological Monographs*, 34(1), 131-177.
- Maneyro, R., & Carreira, S. (2012). Guía de anfibios del Uruguay. Ediciones de la fuga. *Coleccion Ciencia Amiga Press, Uy*. 207pp.
- Maneyro, R. & S. Carreira. (2023). Respuesta de un ensamble de anfibios a la actividad forestal. En: Brazeiro, A (Ed.). Biodiversidad en paisajes forestados de Uruguay. 67 - 86 pp. *Comisión Sectorial de Investigación Científica (UdelaR), Uruguay*.
- Mann, R. M., & Bidwell, J. R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 36, 193-199.
- Marco, A., Quilchano, C., & Blaustein, A. R. (1999). Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the Pacific Northwest, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(12), 2836-2839.
- Martino, D., Methol, M., Oleaga, A., Pirelli, H., Rodríguez, L., Vidal, L., ... & Kindgard, A. (2008). Cambios en el uso de la tierra. *GEO Uruguay*, 56-117.
- Mazerolle, M. J., Desrochers, A., & Rochefort, L. (2005). Landscape characteristics influence pond occupancy by frogs after accounting for detectability. *Ecological Applications*, 15(3), 824-834.
- McDiarmid, R. W., & Altig, R. (Eds.). (1999). *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. University of Chicago Press.

- Means, D. B., Palis, J. G., & Baggett, M. (1996). Effects of slash pine silviculture on a Florida population of flatwoods salamander. *Conservation Biology*, 10(2), 426-437.
- Meintières, S., Biola, A., Pallardy, M., & Marzin, D. (2001). Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. *Mutagenesis*, 16(3), 243-250. DOI: 10.1093/mutage/16.3.243.
- Metcalf, J. L. (1989). Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environmental pollution*, 60(1-2), 101-139.
- MGAP-DGF. (2021). *Cartografía Nacional Forestal 2021*. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección General Forestal. Montevideo, Uruguay. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/resultados-cartografia-forestal-2021>. [último acceso octubre, 2023].
- Montori, A., Llorente, G. A., Carretero, M. A., Santos, X., Richter-Boix, A., Franch, M., & Garriga, N. (2007). Bases para la gestión forestal en relación con la herpetofauna. Camprodon i Subirach, J., Plana Bach, E. (Eds.). Conservación de la biodiversidad, fauna vertebrada y gestión forestal. 2ª edición revisada y ampliada. *Universitat de Barcelona*, 275-335.
- Morand, A., & Joly, P. (1995). Habitat variability and space utilization by the amphibian communities of the French Upper-Rhone floodplain. In *Space Partition within Aquatic Ecosystems: Proceedings of the Second International Congress of Limnology and Oceanography held in Evian, May 25–28, 1993* (pp. 249-257). Springer Netherlands.
- Nardo, D., Evia, G., Castiglioni, E., Egaña, E., Galletta, G., Laporta, M., & Chichet, M. E. N. (2015). Determinación de glifosato mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) en el paisaje protegido Laguna de Rocha y su entorno, Uruguay. *Innotec*, (10), 64-70.
- Natale, G. S., Vera-Candioti, J., de Arcaute, C. R., Soloneski, S., Larramendy, M. L., & Ronco, A. E. (2018). Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 471-479.
- Newman, M. C. (2014). Fundamentals of ecotoxicology: the science of pollution, CRC press., Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York.
- Nosetto, M. D., Jobbágy, E. G., & Paruelo, J. M. (2005). Land-use change and water losses: the case of grassland afforestation across a soil textural gradient in central Argentina. *Global Change Biology*, 11(7), 1101-1117.
- Ouellet, M., Bonin, J., Rodrigue, J., DesGranges, J. L., & Lair, S. (1997). Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of wildlife diseases*, 33(1), 95-104.
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S. L., & Carrasco, A. E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical research in toxicology*, 23(10), 1586-1595.
- Parris, K. M., & Lindenmayer, D. B. (2004). Evidence that creation of a *Pinus radiata* plantation in south-eastern Australia has reduced habitat for frogs. *Acta Oecologica*, 25(1-2), 93-101.

- Paruelo, J. M., Guerschman, J. P., Pineiro, G., Jobbagy, E. G., Verón, S. R., Baldi, G., & Baeza, S. (2006). Cambios en el uso de la tierra en Argentina y Uruguay: marcos conceptuales para su análisis. *Agrociencia Uruguay*, 10(2), 47-61.
- Pavan, F. A., Samojeden, C. G., Rutkoski, C. F., Folador, A., Da Fré, S. P., Müller, C., ... & Hartmann, M. T. (2021). Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2, 4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 85, 103637.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R. C. & Beltzer, A. H. (2003). The effects of habitat fragmentation on amphibian species richness in the floodplain of the middle Parana River. *Herpetological Journal*, 13: 95-98.
- Peltzer, P., Bock, G., Tardivo, R., & Lajmanovich, R. (2004). Effects of habitat loss and fragmentation on anurans in Espinal Eco-region, Argentina: a GIS approach. *Froglog*, 63, 3-4.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., & Cejas, W. (2005). Diversidad y conservación de anuros en ecosistemas agrícolas de Argentina: implicancias en el control bio-lógico de plagas. *Miscelánea*, 14, 399-416.
- Peltzer, P. M. (2006). *La fragmentación de hábitat y su influencia en la diversidad y distribución de anfibios anuros de áreas ecotonaes de los dominios fitogeográficos amazónico y chaqueño* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Beltzer, A. H., & Sanchez, L. C. (2010). Trophic dynamics of three sympatric anuran species in a soybean agroecosystem from Santa Fe Province, Argentina. *The Herpetological Journal*, 20(4), 261-269.
- Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Cabagna-Zenklusen, M.C.; Repetti, M.R. & Beldoménico, H. (2013) a. 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. M., Junges, C. M., Attademo, A. M., Bassó, A., Grenón, P., & Lajmanovich, R. C. (2013) b. Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. *Ecotoxicology*, 22, 1165-1173.
- Peluso, J., Aronzon, C. M., Acquaroni, M., & Coll, C. S. P. (2020). Biomarkers of genotoxicity and health status of *Rhinella fernandezae* populations from the lower Paraná River Basin, Argentina. *Ecological Indicators*, 117, 106588.
- Peluso, M. L., & Carriquiriborde, P. (2021). *Bioensayos de toxicidad*. Libros de Cátedra.
- Pérez-Iglesias, J. M., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G. S., & Larramendy, M. L. (2015). Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 15-24.
- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Natale, G. S., & de Oliveira, C. (2019). Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®)

- exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental pollution*, 244, 733-746.
- Pérez-Iglesias, J. M., Brodeur, J. C., & Larramendy, M. L. (2020). An imazethapyr-based herbicide formulation induces genotoxic, biochemical, and individual organizational effects in *Leptodactylus latinasus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 2131-2143.
- Pollo, F. E., Bionda, C. L., Salinas, Z. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2015). Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental monitoring and assessment*, 187, 1-9.
- Prado, V. H., & Rossa-Feres, D. D. C. (2014). Multiple determinants of anuran richness and occurrence in an agricultural region in south-eastern Brazil. *Environmental management*, 53, 823-837.
- Proyecto MapBiomias Pampa Trinacional. (2023). Colección 2.0 de los Mapas Anuales de Cobertura y Uso del Suelo en Pampa Trinacional. Último acceso: 25 de octubre. <https://pampa.mapbiomas.org/>.
- Quintaneiro, C., Soares, A. M., & Monteiro, M. S. (2018). Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. *Chemosphere*, 194, 595-601.
- Relyea, R. A. (2005). The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological applications*, 15(4), 1118-1124.
- Richardson, D. M., Williams, P. A., & Hobbs, R. J. (1994). Pine invasions in the Southern Hemisphere: determinants of spread and invadability. *Journal of biogeography*, 511-527.
- Ríos, M., Zaldúa, N., & Cupeiro, S. (2010). Evaluación participativa de plaguicidas en el sitio RAMSAR, Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. *Vida Silvestre Uruguay, Montevideo*.
- Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Folador, A., Skovronski, V. J., do Amaral, A. M., Leitemperger, J., ... & Hartmann, M. T. (2020). Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Chemosphere*, 250, 126162.
- Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Folador, A., Skovronski, V. J., do Amaral, A. M., Leitemperger, J. W., ... & Hartmann, M. T. (2021). Cypermethrin-and fipronil-based insecticides cause biochemical changes in *Physalaemus gracilis* tadpoles. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 4377-4387.
- Saccol, S. D. S. A., Bolzan, A. M. R., & dos Santos, T. G. (2017). In the shadow of trees: does eucalyptus afforestation reduce herpetofaunal diversity in Southern Brazil? *South American Journal of Herpetology*, 12(1), 42-56.
- Samojeden, C. G., Pavan, F. A., Rutkoski, C. F., Folador, A., da Fré, S. P., Müller, C., ... & Hartmann, M. (2022). Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). *Scientific reports*, 12(1), 11926.
- Sansiñena, J. A., Peluso, L., Costa, C. S., Demetrio, P. M., Mac Loughlin, T. M., Marino, D. J., ... & Natale, G. S. (2018). Evaluation of the toxicity of the sediments from an

- agroecosystem to two native species, *Hyaella curvispina* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) and *Boana pulchella* (AMPHIBIA: ANURA), as potential environmental indicators. *Ecological indicators*, 93, 100-110.
- Sansiñena, J. A. (2020). *Estudio de calidad ambiental con larvas de anfibios como bioindicadores* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Santos, T. G. (2022). Girinos do Pampa. Base de dados eletrônica acessível em: <https://girinosdopampa.com>. Versão 1.0 (20 de octubre 2023).
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31,9-15. DOI: [10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8).
- Silva, F. R., Oliveira, T. A., Gibbs, J. P., & Rossa-Feres, D. C. (2012). An experimental assessment of landscape configuration effects on frog and toad abundance and diversity in tropical agro-savannah landscapes of southeastern Brazil. *Landscape ecology*, 27, 87-96.
- Smith, A. M., & Green, M. D. (2005). Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations?. *Ecography*, 28(1), 110-128.
- Soloneski, S., Ruiz de Arcaute, C., & Larramendy, M. L. (2016). Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba-and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 17811-17821.
- Soutullo, A., Ríos, M., Zaldúa, N., & Teixeira-de-Mello, F. (2020). Soybean expansion and the challenge of the coexistence of agribusiness with local production and conservation initiatives: pesticides in a Ramsar site in Uruguay. *Environmental Conservation*, 47(2), 97-103.
- Stebbins, R. C., & Cohen, N. W. (1995). *A natural history of amphibians*. Princeton University Press.
- Tellechea, L. F. P., Fonseca, J. A. S., & Sosa, Y. A. C. (2007). Riesgos a la salud humana causados por plaguicidas. *Tecnociencia chihuahua*, 1(3), 4-6.
- Unrine, J. M., Hopkins, W. A., Romanek, C. S., & Jackson, B. P. (2007). Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: implications for amphibian health and contaminant transport. *Environmental Pollution*, 149(2), 182-192.
- USEPA. (1975). USEPA 660/375-009. *Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians*. United States Environmental Protection Agency. Manual. Washington, D.C., EUA, 62 pp.
- USEPA. (1996). Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS850.1800. *Tadpole/sediment Subchronic Toxicity Test*. EPA 712-C-96-132. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances.
- Vanzetto, G. V., Slaviero, J. G., Sturza, P. F., Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Kolcenti, C., ... & Hartmann, M. T. (2019). Toxic effects of pyrethroids in tadpoles of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Ecotoxicology*, 28(9), 1105-1114.
- Vaz-Ferreira, R. & Gerhau, A. (1975). Comportamiento epimelético de la rana común *Leptodactylus ocellatus* (L.) (Amphibia, Leptodactylidae) I. Atención de la cría y actividades alimentarias y agresivas relacionadas. *Physis*, 34: 1-14.

- Veldman, J. W., Overbeck, G. E., Negreiros, D., Mahy, G., Le Stradic, S., Fernandes, G. W., ... & Bond, W. J. (2015). Tyranny of trees in grassy biomes. *Science*, 347(6221), 484-485.
- Vera Candioti, J., Natale, G. S., Soloneski, S., Ronco, A. E., & Larramendy, M. L. (2010). Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere*, 78(3), 249-255.
- Wells, K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press.
- Yin, X., Zhu, G., Li, X. B., & Liu, S. (2009). Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 680(1-2), 2-6.
- Zalba, S. M., Cuevas, Y. A., & Devillalobos, A. E. (2009). Lecciones aprendidas durante siete años de control de pinos invasores en pastizales naturales. En: Cazzaniga, N.J. & Arelovich, H.M. (eds.). *Ambientes y recursos naturales del sudoeste bonaerense: producción, contaminación y conservación*, pp. 325-340. Editorial de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.
- Zhang, W., Chen, L., Xu, Y., Deng, Y., Zhang, L., Qin, Y., ... & Diao, J. (2019). Amphibian (*Rana nigromaculata*) exposed to cyproconazole: changes in growth index, behavioral endpoints, antioxidant biomarkers, thyroid and gonad development. *Aquatic Toxicology*, 208, 62-70.
- Zhelev, Z., Tsonev, S., Georgieva, K., & Arnaudova, D. (2018). Health status of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in Southern Bulgaria and its importance in assessing environmental state: haematological parameters. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 7884-7895.

CAPÍTULO 1. Efectos de la actividad forestal sobre los ensambles de anfibios anuros en el departamento de Treinta y Tres, Uruguay.

Trabajo titulado *“Effects of Forestry Activity on Anuran Amphibians: A Case Study in Uruguay”*, aceptado para su publicación en el Libro: *“Water, Pesticides, Organisms: Current Approach of Ecotoxicology”* (Capítulo 18). Marília Hartmann, Paulo Afonso Hartmann, Caroline Müller, Aline Pompermaier (Eds). El capítulo de libro se adjunta en el Anexo I.

INTRODUCCIÓN

Los anfibios son los vertebrados más amenazados a nivel mundial, con un 41% de las especies en peligro de extinción (IUCN, 2023). Según la última Lista Roja de los anfibios y reptiles del Uruguay de las 49 especies de anfibios evaluadas, doce se encuentran en alguna categoría de amenaza, mientras que cuatro se consideran “casi amenazadas” (Carreira & Maneyro, 2015). Dentro de las principales amenazas para este grupo, tanto a nivel global como local, se destaca la destrucción y fragmentación del hábitat provocada por los cambios en el uso del suelo (Collins & Crump, 2009; Carreira & Maneyro, 2019), impulsados principalmente por la actividad agrícola y la urbanización (IUCN, 2023). En Uruguay, al igual que en el resto de América del Sur, uno de los principales cambios en el uso del suelo es la transformación de grandes áreas de pastizales naturales en monocultivos forestales (Nosetto, *et al.*, 2005; Fonseca *et al.* 2009; Veldman *et al.* 2015; Baeza & Paruelo, 2020). En los últimos años se ha registrado una importante expansión de las plantaciones de árboles exóticos de rápido crecimiento (principalmente eucaliptos y pinos), destinadas a la producción de madera y celulosa, superando actualmente el millón de hectáreas (MGAP-DGF, 2021). Esto, en conjunto con la actividad agrícola, provocó la pérdida de 2 millones de hectáreas (16.8%) de pastizales naturales del Uruguay, en el período comprendido entre 1985 y 2022 (Proyecto MapBiomass Pampa Trinacional, 2023). La silvicultura a gran escala provoca modificaciones en la estructura del paisaje y una reducción en la heterogeneidad ambiental, lo cual repercute negativamente sobre la diversidad de especies (Parris & Lindenmayer, 2004; Machado *et al.* 2012; Saccol *et al.* 2017; Gangenova *et al.*, 2018; Allingham, 2020; Kellermann *et al.*, 2021). En este sentido, varios estudios han demostrado que ambientes complejos, que proporcionan más variedad de microhábitats poseen una mayor riqueza de especies de anfibios en relación con los ambientes homogéneos (ej. Afonso & Eterovick, 2007; Bastazini *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2019). Además, los monocultivos forestales generan otros impactos en los ecosistemas que pueden afectar de forma directa o indirecta a la biota; como por ejemplo: reducción en el rendimiento hidrológico (Le Maitre *et al.*, 2000; Nosetto *et al.*, 2005; Jobbágy *et al.*, 2006); deterioro de la calidad del agua y del suelo (Jobbágy *et al.*, 2006; Schvezov *et al.*, 2023); modificación en el ciclo de nutrientes (Jackson *et al.*, 2002; Jobbágy *et al.*, 2006); variaciones fisicoquímicas a nivel del suelo (ej. caída del pH) (Jobbágy *et al.*, 2006; Schvezov *et al.*, 2023); así como un incremento en el sombreado (Means *et al.*, 1996; Parris & Lindenmayer, 2004; Machado *et al.*, 2012), entre otros. Cabe destacar que el efecto de la forestación no sólo se percibe como la transformación de la estructura del ambiente durante el periodo de plantación, sino también en la etapa poscosecha (Knapp *et al.*, 2003).

Los anfibios son particularmente sensibles a estas alteraciones como consecuencia de sus características biológicas y fisiológicas (por ej. presencia de un ciclo de vida doble agua-tierra, piel delgada y permeable, alta tasa de bioacumulación, etc.) (Wells, 2007). Por su ciclo de vida complejo, muchas especies dependen de la presencia de hábitats acuáticos (donde ocurre la reproducción y el desarrollo); y terrestres (contienen los sitios de alimentación y refugio) (Wells, 2007). En consecuencia, responden a cambios en las condiciones ambientales en ambos ecosistemas (Stebbins & Cohen, 1995; Cushman, 2006; Becker *et al.*, 2007). Además, son animales que en general presentan una baja capacidad de dispersión y una alta fidelidad de sitio (Smith & Green, 2005; Caldwell & Shepard, 2007), siendo particularmente vulnerables a las alteraciones a nivel del paisaje (Cushman 2006; Cayuela *et al.*, 2015). Cabe mencionar que a menudo los efectos provocados por las plantaciones forestales sobre los anuros suelen ser más sutiles que un cambio en la riqueza o composición de especies, afectando por ejemplo al estado energético de los individuos (efectos a nivel individual) (Maneyro & Carreira, 2023). Por otra parte, los agroquímicos utilizados durante el manejo forestal pueden contaminar cuerpos de agua superficiales asociados a estos agroecosistemas, y provocar alteraciones en los parámetros sanguíneos de larvas de anuros expuestas (efectos a nivel celular) (Babini *et al.*, 2015; 2016). Estas alteraciones incluyen la presencia de Micronúcleos (MN), y de otras aberraciones nucleares en los eritrocitos (ANE), que son indicadoras de daño a nivel genético (Benvindo-Souza *et al.*, 2020). Por su gran sensibilidad frente a los cambios ambientales, y por cumplir con las principales características que debe poseer un indicador biológico (ej. ser ubicuos, abundantes, fácilmente detectables, de fácil muestreo, y relativamente sedentarios, entre otras cosas) (ver Metcalfe; 1989); los anfibios son considerados buenos bioindicadores de calidad ambiental. En consecuencia, varios estudios los han utilizado como bioindicadores para abordar los efectos de la degradación del hábitat (ej. Eterovick *et al.*, 2016; Saccol *et al.*, 2017; Bionda *et al.*, 2018).

Las plantaciones de árboles del género *Pinus* (con predominio de las subespecies *P. elliottii* y *P. taeda*), ocupan el 14.2% del área total forestada en Uruguay, y se concentran principalmente en los departamentos de Rivera, Tacuarembó, Cerro Largo y Treinta y tres (MGAP-DGF, 2021). La forestación con pinos genera varios impactos sobre los ecosistemas naturales a causa de su gran potencial de invasión (Machado *et al.*, 2012; Zalba *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 1994; Bustamante & Simonetti, 2005). Existe evidencia de que los monocultivos de *Pinus spp.* reducen la riqueza de anfibios anuros y producen cambios en la composición de los ensambles (Parris & Lindenmayer, 2004; Machado *et al.*, 2012; Gangenova *et al.*, 2018). Como mencionamos anteriormente, la actividad forestal viene creciendo sostenidamente en el país, sin embargo, son escasos los estudios que evalúan el efecto de esta actividad sobre los

ensambles de anfibios (ej. Maneyro & Carreira, 2023). La expansión de la silvicultura acentúa la necesidad de realizar estudios para poder comprender los efectos potenciales que esta actividad puede tener sobre la biota.

El objetivo general de este estudio es evaluar los efectos de la actividad forestal con pinos sobre anfibios anuros, en el departamento de Treinta y Tres, Uruguay. Los objetivos específicos son: 1. analizar los cambios en la riqueza y composición de los ensambles de anfibios anuros entre sitios afectados por la forestación y un sitio control dentro de un área protegida; 2. comparar la calidad del agua entre los sitios forestales y el sitio control; y 3. determinar la incidencia de la actividad forestal sobre la condición corporal y los parámetros de las células sanguíneas en individuos de *Pseudis minuta* (Anura: Hylidae).

Hipótesis:

Las alteraciones a nivel ambiental asociadas a la presencia y al manejo de las plantaciones de pinos, afectan a los anfibios de estos agroecosistemas, a distintos niveles de organización.

Predicciones:

1. Se encontrará una menor riqueza de especies de anuros en los sitios afectados por la forestación con pinos en relación con el sitio control.
2. La composición de especies será diferente entre los sitios forestales y el sitio control.
3. Los individuos de *Pseudis minuta* presentes en el sitio control tendrán un mejor estado energético que los individuos del sitio forestal.
4. Se observará una mayor frecuencia de micronúcleos y de otras aberraciones nucleares en los eritrocitos de sangre de las larvas provenientes del sitio afectado por la forestación, en comparación con las larvas del sitio control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y sitios de muestreo

El estudio se llevó a cabo en el Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos y Sierras del Yermal (PPQC y SY) (32°55'39"S; 54°27'25"O), y cercanías (Departamento de Treinta y Tres, Uruguay) (Figura 1). El PPQC y SY integra el grupo de quebradas del noreste uruguayo con relictos de selva subtropical y forma parte del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) del Uruguay, desde el año 2008. Entre los diferentes ambientes presentes en el área protegida se destacan el bosque de quebrada y galería junto al sistema fluvial y las praderas naturales (cubren el 50 % del área) (SNAP, 2010). Una de las principales presiones que ocurren actualmente en el área adyacente al PPQC y SY es el avance de la forestación con monocultivos de pinos y eucaliptus (se estima en no menos de 6000 has). Todos los suelos del área protegida y el 90% de los

suelos de la zona adyacente son de prioridad forestal (SNAP, 2010). Por lo tanto, el fenómeno de intensificación y expansión de la forestación que ocurrió en la zona se debió a las políticas de estado que beneficiaron a los emprendimientos que se desarrollaron en estos suelos (Panario & Gutiérrez, 2007). En la zona de estudio, las precipitaciones ocurren durante todo el año, pero son mayores durante el verano y el otoño. Para los últimos 50 años, la precipitación acumulada anual fue de 1600 mm; mientras que la temperatura media anual fue de 17°C (INIA, 2022).

Dentro de los límites del área protegida, existe una zona de pastizal natural, en la cual se ha excluido toda actividad ganadera y cualquier otro tipo de actividad antrópica durante los últimos 20 años. En este sitio, considerado como el área control (en adelante lo denominaremos NF) (Figura 1), fueron seleccionados tres cuerpos de agua: Ch1NF (32,90579°S; 54,44522°WO); Ch2NF (32,912 76°S; 54,45073°WO); y Ch3NF (32,91115°S; 54,45263°WO) (Figura 2). Adicionalmente, se seleccionaron cuerpos de agua dentro de dos sitios afectados por la forestación con *Pinus taeda*, ubicados en áreas adyacentes al PPQC y SY, y en la misma cuenca. Uno de estos sitios se corresponde con una plantación recientemente cosechada (en adelante FA) y se ubica a 7.75 km del área control; mientras que, en el otro sitio ubicado a 4.87 km del control, existe una plantación activa de Pinos de 9 años (en adelante FB) (Figura 1). Fueron seleccionados dos cuerpos de agua en cada uno de estos sitios: Ch1FA, Ch2FA; Ch1FB y Ch2FB, respectivamente (Figura 2).

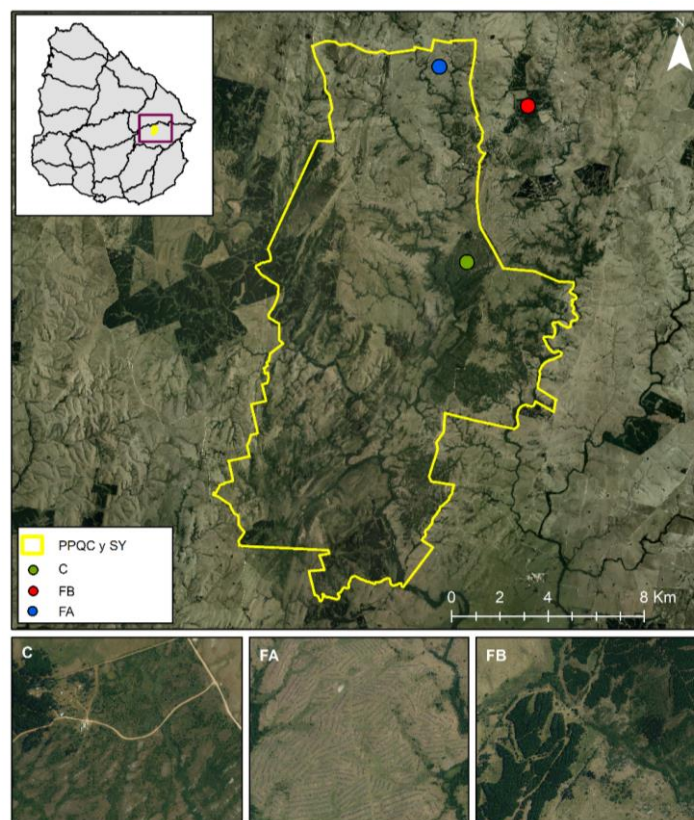


Figura 1. Área de estudio. La línea amarilla delimita la zona del Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos y Sierras del Yermal. La marca verde representa el sitio Control (C); la marca roja representa el sitio donde se ubica la plantación activa de pinos (FB); y la marca azul representa a la zona cosechada (FA).



Figura 2. Sitios de muestreo. A. Charco Ch1NF dentro del sitio control (C); B. Charco Ch1FA dentro de la zona cosechada (FA); C. Charco Ch2FB dentro de la plantación activa de pinos (FB).

Riqueza y composición de anfibios en los sitios de muestreo

Se efectuaron salidas de campo estacionales de tres días de duración, entre setiembre del 2018 y marzo del 2020. Durante cada salida se realizaron muestreos auditivos de machos vocalizadores, y muestreos de larvas, en cada uno de los charcos seleccionados, con el objetivo de conocer las especies de anuros presentes en cada sitio. Los muestreos auditivos fueron nocturnos, de 15 minutos de duración cada uno (Heyer *et al.*, 1994), y se realizó una cuantificación categórica de las vocalizaciones, usando para ello cuatro categorías: ocasional (1 solo individuo cantando), raro (2 a 4 individuos), abundante (más de 4 individuos, pero se pueden contar), y coro (no se pueden individualizar las vocalizaciones) (Moulton *et al.*, 1996). Los muestreos de larvas se realizaron por la tarde, durante las horas de luz. Dos personas, efectuaron barridas al azar utilizando calderines de mano en cada uno de los charcos de monitoreo, tratando de cubrir la totalidad de su superficie, hasta alcanzar un tamaño de muestra de al menos 100 individuos por cada charco. Las larvas capturadas fueron identificadas taxonómicamente al nivel de especie y luego se liberaron en el sitio de captura. Las larvas de las especies que no pudieron ser identificadas *in situ*, se acondicionaron en recipientes plásticos con agua del lugar para su traslado al laboratorio, y posteriormente fueron criadas bajo condiciones controladas: temperatura del agua-aire $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 12-12 (horas luz-oscuridad) y oxigenadores con burbujeo constante, hasta el final de la metamorfosis para su correcta determinación taxonómica. Cabe destacar que se registraron todas las especies de anuros que fueron identificadas visualmente durante ambos muestreos.

Caracterización de los sitios de muestreo

Todos los charcos seleccionados en NF, FA y FB, fueron caracterizados. Para ello se registraron las siguientes variables: área, perímetro, porcentaje de cobertura vegetal (dentro y fuera del charco), y la profundidad media (utilizando un metro

plegable plástico de 1mm de precisión). El porcentaje de cobertura vegetal dentro y fuera de cada cuerpo de agua seleccionado, se registró en cada salida de campo usando el método de Relevé (Mueller-Dombois & Ellenberg, 1974). También se caracterizó el tipo de suelo determinando su textura (proporción de arena, limo y arcilla), su porcentaje de materia orgánica, y su pH. Para esto, se tomaron muestras de suelo a 5 cm de profundidad en cada uno de los charcos utilizando una caladora. Se tomaron 3 muestras de suelo por charco, compuesta cada una de ellas por 10 submuestras. Cada muestra se acondicionó en una bolsa plástica etiquetada, y se colocó dentro de una heladera portátil con refrigerantes para su traslado al laboratorio. Los análisis se realizaron en el Laboratorio Analítico Agroindustrial S.A (Paysandú; Uruguay), utilizando los siguientes métodos analíticos: Bouyoucos (textura); Walkley-Black Method (materia orgánica); y potenciométrico (pH agua). Durante cada muestreo auditivo, y de larvas, se determinó la calidad del agua, midiendo el pH, la conductividad (μSs^{-1}), la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), y el porcentaje de oxígeno disuelto (mg L^{-1}) en cada charco, utilizando un multiparámetro (HACH® Sension™156). También se registró la hora, el aspecto del agua, y la temperatura del aire ($^{\circ}\text{C}$). Adicionalmente, durante el primer año de muestreo, en cada salida de campo se tomaron muestras de agua de cada charco entre las 08:00 y las 11:00 horas, para las posteriores cuantificaciones de nitrato, amonio y fosfato disueltos. Estas muestras se colocaron en frascos plásticos y también fueron refrigeradas para su traslado al laboratorio. Todas las muestras de agua fueron filtradas y congeladas para su posterior análisis en el Laboratorio de Limnología de la Facultad de Ciencias donde fueron cuantificados a través del método de espectrofotometría. A partir del segundo año de muestreo (setiembre 2019), los nitratos, amonio, y fosfatos disueltos en agua, así como la turbidez del agua, fueron cuantificadas en campo utilizando un colorímetro LaMotte (modelo: Smart 3 1910) y kits comerciales, precalibrados para este equipo.

Índice de Condición Corporal (BCI) en individuos adultos de *Pseudis minuta*

Se seleccionó a *Pseudis minuta* (Anura: Hylidae), como especie bioindicadora en el área de estudio, por estar presente en todos los sitios de muestreo. Se trata de una especie ampliamente distribuida en Uruguay, de hábitos acuáticos, que está presente en todas las zonas naturales del país, y también puede encontrarse en ambientes antropizados (Maneyro & Carreira, 2012). No se encuentra amenazada a escala local (Carreira & Maneyro, 2019); ni global (Kwet *et al.*, 2004). Durante las salidas de febrero, setiembre y noviembre de 2019, luego de los muestreos auditivos nocturnos, fueron capturados individuos adultos de *P. minuta* en actividad reproductiva (Figura 3a) en los charcos del área control (Ch1NF, Ch2NF, y Ch3NF) y en los charcos de los sitios afectados por la forestación (Ch1FA, Ch2FA, Ch1FB y Ch2FB). Todos los individuos capturados fueron sexados, y se determinó su tamaño (LHC=longitud hocico-cloaca en

mm), y masa (M en gramos) en el campo (Figura 3b), con el fin de determinar el Índice de Condición Corporal (BCI). Este índice es un indicador del estado energético de los individuos (Băncilă *et al.*, 2010). Luego de registrar todos los datos los individuos fueron devueltos al sitio de captura.



Figura 3. a. Pareja de *Pseudis minuta* colectada durante los muestreos en el sitio de estudio (se encontraba en amplexo en el momento de la colecta); **b.** Determinación de la masa de individuo adulto de *P. minuta* en campo.

Parámetros de las células sanguíneas (MN y ENA) en larvas de *Pseudis minuta*

Durante la salida de setiembre del 2018, se colectaron 8 larvas de *P. minuta*, del charco Ch1NF del sitio control; y 8 larvas del charco Ch2FB del sitio forestal, para la medición de parámetros de las células sanguíneas. Las larvas fueron sacrificadas siguiendo los protocolos experimentales aprobados por la Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias (protocolos 474 y 684), luego se les extrajo sangre utilizando capilares heparinizados, y se prepararon frotis por duplicado que fueron teñidos aplicando la técnica May-Grünwald Giemsa (Barni *et al.*, 2007; Lajmanovich *et al.*, 2014). Se determinó la frecuencia de MN y de ANE en 1000 eritrocitos por cada larva utilizando un microscopio óptico Olympus BX41, con una magnificación de 1000x (Lajmanovich *et al.*, 2014). Los portaobjetos codificados y aleatorizados fueron puntuados a ciegas por un solo observador. Se tomaron fotografías de los frotis con una cámara Evolution vf cooled color, y las imágenes se procesaron con el Software ImageJ (National Institute of Health, USA). Los MN fueron identificados siguiendo los criterios de Fenech (2000) y Meintières *et al.* (2001); y las distintas ANE se clasificaron según los criterios de Carrasco (1990), Guilherme *et al.* (2008), y Lajmanovich *et al.* (2014).

Análisis de datos

La comparación de la riqueza de especies entre los sitios de estudio se basó en curvas de rarefacción (método de interpolación y extrapolación) (Chao & Jost, 2012). Los intervalos de confianza (95%) asociados con las curvas se calcularon utilizando el método Bootstrap (50 aleatorizaciones). Estos análisis se realizaron utilizando el paquete iNEXT (iNterpolation and Extrapolation) versión 3.0 del Software R (Hsieh *et al.*, 2016).

En todos los casos para probar la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas, se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk (SW) y Levene (Zar, 2010), respectivamente, y en caso de no cumplirse con estos supuestos, se utilizó estadística no - paramétrica. Las diferencias en la riqueza de especies entre los sitios de estudio se evaluaron utilizando el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis (Zar, 2010); y para comparar la riqueza entre estos sitios considerando el momento de muestreo se utilizó el test no paramétrico de Friedman (Zar, 2010). Por otra parte, las variaciones en la composición de especies entre las comunidades asociadas a los distintos sitios se calcularon mediante el índice de complementariedad (C) de Colwell y Coddington (1994). Este índice expresa las diferencias en los listados de especies de dos hábitats y va de 0 (los listados de especies entre sitios son idénticos) a 1 (listados completamente distintos) (Moreno, 2001). Con el objetivo de evaluar si no existen diferencias significativas en la composición de especies entre los sitios NF, FA y FB, se realizó un análisis de varianza permutacional multivariado (PERMANOVA), con 999 permutaciones, teniendo en cuenta la matriz de distancias entre sitios elaborada con el método de Jaccard (Borcard *et al.* 2011; Magurran & McGill 2011). Los análisis se realizaron utilizando la función Adonis del paquete VEGAN (Oksanen *et al.*, 2019) en R.

Las diferencias en las variables fisicoquímicas del agua entre los tres sitios de muestreo se evaluaron utilizando el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y en caso de detectar diferencias significativas entre sitios, se aplicó el test U de Mann-Whitney corregido por el criterio de Bonferroni (Zar, 2010). Se determinó el Índice de Condición Corporal (BCI) de los individuos de *P. minuta*, a partir de los residuos de la regresión $\text{Log}(M) = f[\text{Log}(LHC)]$ (Băncilă *et al.*, 2010). Las diferencias en la condición corporal entre los sitios de muestreo, también se evaluaron mediante el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis (Zar, 2010). Finalmente, para los análisis de genotoxicidad, las frecuencias de ocurrencia de MN y de ANE se consideraron en conjunto, y se expresaron como la media $\pm$ el error estándar. Los datos de MN+ANE se analizaron utilizando el test de proporción binomial (Margolin *et al.*, 1983).

Los análisis estadísticos fueron realizados con el Software PAST (Paleontological STatistics) versión 2.17c (Hammer *et al.*, 2001); InfoStat versión 2020

(Di Rienzo *et al.*, 2020); BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007); y R versión 4.2.2 (R Core Team, 2022). En todos los casos el nivel de significancia se estableció a $\alpha=0.05$.

RESULTADOS

Caracterización de los sitios de muestreo

Dentro del sitio control, el charco Ch1NF tiene un área de 968.26 m², el Ch2NF de 2531.11 m² y el Ch3NF de 274.88 m². Los cuerpos de agua Ch1FA y Ch2FA, ubicados en el sitio recientemente cosechado tienen un área de 1314.61 m² y 1223.35 m², respectivamente. Dentro de la plantación activa, Ch1FB tiene un área de 158.16 m² y Ch2FB de 1223.35 m². En los muestreos de otoño e invierno, se observó una disminución en el porcentaje de cobertura vegetal, sobre todo dentro de los charcos, en los distintos sitios de muestreo (Tabla 1). En relación con la textura del suelo, los tres sitios presentaron una proporción similar de arcilla (Tabla 2). En el sitio FA el suelo es más liviano, con una elevada proporción de arena, mientras que en FB y NF la textura es más fina, y los suelos más pesados, ya que se registró una elevada proporción de limo (Tabla 2). El porcentaje de materia orgánica, y el pH del suelo fue similar en los tres sitios de estudio (Tabla 2). En relación con las variables fisicoquímicas de agua (Tabla 3), no se encontraron diferencias significativas para los siguientes parámetros entre los sitios de estudio: temperatura del agua (°C) ($H=0.32$; $p=0.85 >0.05$); pH ($H=0.13$; $p=0.94 >0.05$); conductividad ($\mu\text{Ss-1}$) ($H=1.88$; $p=0.39 >0.05$); oxígeno disuelto (mg L⁻¹) ($H=5.11$; $p=0.08 >0.05$); profundidad del agua (cm) ($H=0.04$; $p=0.98 >0.05$); y concentración de amonio (mg/L) ($H=1.22$; $p=0.58 >0.05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la temperatura del aire (°C) entre los sitios ($H=2.35$; $p=0.31 >0.05$). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la concentración de nitrato entre los charcos de estudio (mg/L) ($H=9.35$; $p=0.002 <0.05$); con una mayor concentración en el sitio FA en relación con el control ($p=2.4e-3 <0.05$). También se encontraron diferencias en la concentración de fosfato (mg/L) ($H=10.97$; $p=0.004 <0.05$); con una mayor concentración en el sitio FA en comparación con el control ($p=0.01 <0.05$) y con FB ($p=3.4e-3 <0.05$).

Tabla 1. Variación estacional en el porcentaje de cobertura vegetal en los distintos sitios de muestreo. Referencias: Ch1NF; Ch2NF y Ch3NF, se corresponden a los charcos del sitio control dentro de los límites del área protegida; Ch1FA y Ch2FB son los charcos presentes dentro del sitio recientemente cosechado; Ch1FB y Ch1FB son los charcos presentes en la forestación activa.

	Porcentaje de cobertura vegetal por sitio de muestreo (afuera del charco/adentro del charco)						
Estación	Ch1NF	Ch2NF	Ch3NF	Ch1FA	Ch2FA	Ch1FB	Ch2FB
Verano	100%/100%	100%/100%	100%/100%	100%/80%	100%/90%	100%/100%	100%/85%
Otoño	85%/25%	100%/95%	100%/95%	100%/25%	100%/50%	100%/30%	100%/50%
Invierno	100%/60%	100%/90%	100%/90%	20%/35%	40%/20%	90%/50%	20%/35%
Primavera	90%/90%	100%/100%	100%/100%	95%/95%	100%/100%	90%/75%	90%/90%

Tabla 2. Caracterización del suelo en los distintos sitios de muestreo. Referencias: FA: sitio recientemente cosechado; FB: sitio donde se encuentra la forestación activa.

Sitio de muestreo	Textura			Materia Orgánica (%)	pH
	Arcilla (%)	Arena (%)	Limo (%)		
CONTROL	15	11	74	5.1	4.6
FA	15	80	5	5.5	5.2
FB	17	5	78	5.1	4.7

Tabla 3. Resumen de las variables fisicoquímicas del agua en cada sitio de muestreo.

Variables fisicoquímicas del agua	Sitios de estudio		
	Control	FA	FB
Temperatura del agua (°C)	23.2 ± 6.4	22.2 ± 5.1	24 ± 7.9
pH	6.9 ± 0.7	6.0 ± 0.7	6.7 ± 0.6
Conductividad (µS/cm)	40.4 ± 11.3	45.7 ± 9.3	46.8 ± 12.9
Oxígeno disuelto (mg/L)	5 ± 3.3	8 ± 2.2	10 ± 2.8
Profundidad (cm)	23.24 ± 11	23.8 ± 5.8	23.4 ± 4
Nitrato (mg/L)	0.08 ± 0.06	0.22 ± 0.06	0.16 ± 0.02
Amonio (mg/L)	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.13 ± 0.13
Fosfato (mg/L)	0.008 ± 0.001	0.02 ± 0.01	0.004 ± 0.003

Riqueza y composición de anfibios en los sitios de muestreo

A partir de los muestreos diurnos de larvas se identificó la presencia de nueve especies de anuros en el sitio control (Ch1NF=7 spp; Ch2NF=3 spp; y Ch5NF=2 spp), ocho especies en el sitio recientemente cosechado FA (Ch1FA=6 spp; y Ch2FA=6 spp), y nueve especies en la forestación activa FB (Ch1FB=6 spp; Ch2FB=7 spp) (Tabla 4). Durante los muestreos auditivos nocturnos de machos vocalizadores fueron identificadas once spp de anuros en todos los sitios, en el sitio control (Ch1NF=10 spp; Ch2NF=9 spp; y Ch3NF=6 spp), en el sitio recientemente cosechado FA (Ch1FA=9 spp y Ch2FA=10 spp), y en la forestación activa FB (Ch1FB=7 spp y Ch2FB=7 spp) (Tabla 4). Cabe destacar que en los sitios Ch1NF; Ch2NF; Ch3NF; Ch2FA, Ch1FB; y Ch2FB, se registró el canto de machos de especies pertenecientes al género *Physalaemus*, pero

no fue posible distinguir entre los taxones simpátricos *Physalaemus gracilis* y *P. biligonigerus* a través del registro auditivo (Tabla 4). Durante los muestreos diurnos y nocturnos, se identificaron visualmente trece spp de anuros en el sitio control (Ch1NF=10 spp; Ch2NF=6 spp; y Ch3NF=4 spp); diez especies en el sitio FA (Ch1FA=8 spp y Ch2FA=6 spp); y doce spp en FB (Ch1FB=7 spp y Ch2FB=11 spp) (Tabla 4). Por lo tanto, considerando en conjunto los distintos métodos de muestreo y las especies que fueron vistas durante cada uno de estos eventos, se registraron en total 16 especies de anuros en el sitio control distribuidas en tres familias: Hylidae (8 especies), Leptodactylidae (7), y Odontophrynidae (1). Por otra parte, en el sitio FA se registraron un total de 15 especies distribuidas en 4 familias: Hylidae (7 especies), Leptodactylidae (7), Microhylidae (1), y Odontophrynidae (1), mientras que en el sitio FB se registraron 16 especies pertenecientes a las familias: Hylidae (7 especies), Leptodactylidae (7), Microhylidae (1), y Odontophrynidae (1) (Tabla 4). No se encontraron diferencias significativas en la riqueza total de especies entre los tres sitios de estudio ($H=1.65$; $p=0.50 >0.05$); lo cual se evidenció en las curvas de rarefacción (Figura 4). Tampoco se observaron diferencias en el número de especies entre los sitios, considerando las distintas estaciones de muestreo ($\chi^2=1.14$; $p=0.35 >0.05$).

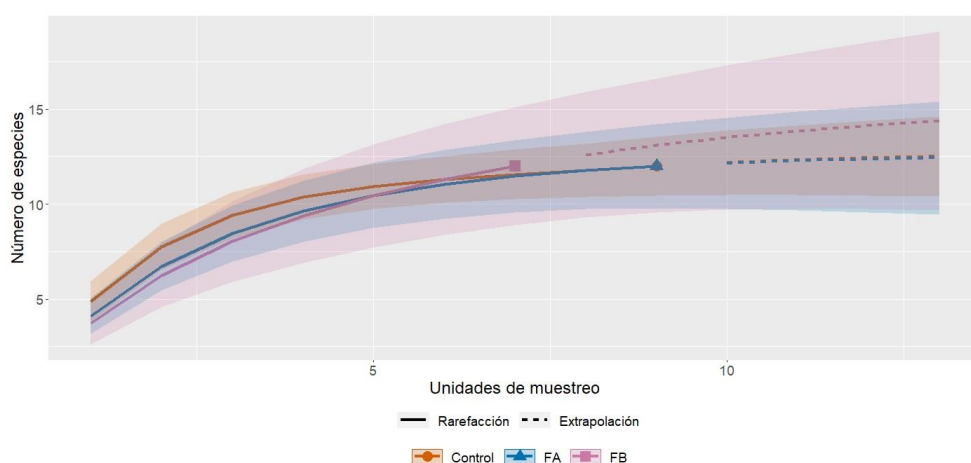


Figura 4. Comparación de la riqueza de especies de anfibios en dos sitios afectados por la forestación y un sitio control, ubicados en el departamento de Treinta y Tres, Uruguay, mediante rarefacción. Referencias: 1. Control (círculo naranja): sitio control dentro del PPQC y SY; 2. FA (triángulo azul): plantación de *Pinus taeda* recientemente cosechada; 3. FB (cuadrado rosa): plantación activa de *P. taeda*.

No se observaron diferencias significativas en la composición de especies de anuros entre los sitios de estudio ($F=1.04$; $p=0.39 >0.05$). El índice de complementariedad mostró que la composición de especies entre FA y FB fue más similar ($C=6,25\%$); en comparación con cada uno de estos sitios y el control ($CNF/FA=27,7\%$; $CNF/FB=22,2\%$). Cabe destacar que la especie *Phyllomedusa huringii* (Anura: Hylidae), solo fue registrada en Ch1NF, dentro del área control. La

especie *Pseudopaludicola falcipes* (Anura: Leptodactylidae), fue vista durante los muestreos diurnos, y se registraron machos vocalizadores durante el día, pero no se escucharon durante los muestreos auditivos nocturnos.

TABLA 4. Especies de anuros presentes en los sitios de muestreo y métodos de registro por sitio. Referencias: Ch1NF; Ch2NF y Ch3NF, se corresponden a los charcos del sitio control dentro de los límites del área protegida; Ch1FA y Ch2FB son los charcos presentes dentro del sitio recientemente cosechado; Ch1FB y Ch1FB son los charcos presentes en la forestación activa. A=registro auditivo; L=presencia de larvas; V=registro visual. El asterisco (*) indica que la especie no se puede distinguir de otros taxones simpátricos a través del registro auditivo.

Familia/Especie	Sitios de muestreo	Método de registro
Familia Hylidae		
<i>Dendropsophus sanborni</i> (Schmidt, 1944)	Ch1NF Ch1FB Ch2FB	A A/V A
<i>Dendropsophus minutus</i> (Peters, 1872)	Ch1NF Ch2NF Ch3NF Ch1FA Ch2FA Ch2FB	A/L/V A A A A/L A/L/V
<i>Boana pulchella</i> (Duméril and Bibron, 1841)	Ch1NF Ch2NF Ch1FA Ch2FA Ch1FB Ch2FB	A/L/V A A/L/V A/L/V A/L/V A/L/V
<i>Phyllomedusa iheringii</i> Boulenger, 1885	Ch1NF	A/L/V
<i>Pseudis minuta</i> Günther, 1858	Ch1NF Ch2NF Ch3NF Ch1FA Ch2FA Ch1FB Ch2FB	A/L/V A A/V A A L/V A/L/V
<i>Scinax granulatus</i> (Peters, 1871)	Ch1NF	A/L/V

<i>Scinax squalirostris</i> (Lutz, 1925)	Ch2NF	A
	Ch3NF	A
<i>Julianus uruguayus</i> (Schmidt, 1944)	Ch1FA	A/L/V
	Ch2FA	A/L/V
	Ch1FB	L/V
	Ch2FB	A/V
	Ch1NF	A/L/V
	Ch2NF	A/L/V
	Ch3NF	A/L/V
	Ch1FA	A
	Ch2FA	A/L/V
	Ch1FB	A/L/V
	Ch2FB	A/L/V
Familia Leptodactylidae		
<i>Leptodactylus gracilis</i> (Duméril and Bibron, 1841)	Ch1NF	A/V
	Ch2NF	A/V
	Ch3NF	A/V
	Ch1FA	A/V
	Ch2FA	A
	Ch1FB	A
<i>Leptodactylus latinasus</i> Jiménez de la Espada, 1875	Ch2NF	A/V
	Ch1FA	A
	Ch1FB	A
<i>Leptodactylus luctator</i> (Hudson, 1892)	Ch1NF	A/V
	Ch2NF	A/L/V
	Ch3NF	L/V
	Ch1FA	L/V
	Ch2FA	A/L/V

<i>Leptodactylus mystacinus</i> (Burmeister, 1861)	Ch2FB	A/L/V
	Ch1NF	A
	Ch2NF	A/V
	Ch3NF	A
	Ch1FA	V
	Ch2FA	A
	Ch1FB	A
<i>Physalaemus biligonigerus</i> (Cope, 1861)	Ch1NF	A*/
	Ch2NF	A*/
	Ch3NF	A*/
	Ch2FA	A*/V
	Ch1FB	A*/
	Ch2FB	A*/L/V
<i>Physalaemus gracilis</i> (Boulenger, 1883)	Ch1NF	A*/
	Ch2NF	A*/L/V
	Ch3NF	A*/
	Ch2FA	A*/
	Ch1FB	A*/L/V
	Ch2FB	A*/V
<i>Pseudopaludicola falcipes</i> (Hensel, 1867)	Ch1NF	V
	Ch1FA	L/V
	Ch1FB	L/V
	Ch2FB	L/V
Familia Microhylidae		
<i>Elachistocleis bicolor</i> (Guérin-Méneville, 1838)	Ch1FA	A
	Ch2FA	A
	Ch2FB	V

Familia Odontophrynidae			
<i>Odontophrynus</i>	<i>asper</i>	Ch1NF	L/V
(Philippi, 1902)		Ch1FA	L/V
		Ch1FB	L/V

Índice de Condición Corporal (BCI) y parámetros de las células sanguíneas en *Pseudis minuta*

En la Tabla 5 se muestra el número total de individuos de *Pseudis minuta* capturados por sitio y por salida de campo, así como los valores medios de LHC en mm; y masa en g. No se encontraron diferencias significativas en el BCI de los individuos de *P. minuta* entre los tres sitios de estudio ($H=1.65$; $p=0.50 >0.05$). Por otra parte, identificamos la presencia de eritrocitos micronucleados, y la única aberración nuclear observada en las larvas de *P. minuta* fue la de núcleos con muescas. La frecuencia de MN+ENA en larvas provenientes del sitio forestal fue significativamente mayor que en larvas provenientes del sitio control ($Z= -1.88$; $p=0.03 <0.05$) (Figura 5).

Tabla 5. Valores medios de LHC (mm) y M (g) de los individuos de *P. minuta* colectados por sitio en cada evento de muestreo.

Sitios de muestreo	Mes de muestreo	n	LHC mm $\pm$ SD (min-max)	M g $\pm$ SD (min-max)
Control (Ch1NF+Ch2NF+Ch3NF)	Feb-19	16	38,44 $\pm$ 6,24 (27,66-48,74)	6,91 $\pm$ 3,08 (2,6-12,1)
FA (Ch1FA+Ch2FA)	Feb-19	11	38,83 $\pm$ 1,46 (32,64-48,63)	7,8 $\pm$ 3,34 (4,5-16,1)
FB (Ch1FB+Ch2FB)	Feb-19	13	39,22 $\pm$ 6,13 (30,88-49,35)	8,24 $\pm$ 3,94 (3,2-16,1)
Control (Ch1NF+Ch2NF+Ch3NF)	set-19	15	36,33 $\pm$ 4,85 (25,27-43,54)	6,54 $\pm$ 2,42 (3,4-12)
FA (Ch1FA+Ch2FA)	set-19	14	37,70 $\pm$ 3,52 (33,1-43,67)	7,67 $\pm$ 2,48 (4,9-12)
FB (Ch1FB+Ch2FB)	set-19	16	36,49 $\pm$ 3,35 (29,36-41)	5,63 $\pm$ 1,47 (3,1-7,5)
Control (Ch1NF+Ch2NF+Ch3NF)	Nov-19	20	36,56 $\pm$ 5,02 (28,77-47,48)	6,61 $\pm$ 2,89 (2,9-15)
FA (Ch1FA+Ch2FA)	Nov-19	5	35,94 $\pm$ 7,62 (25,73-45,77)	7,88 $\pm$ 5,09 (2,5-15)
FB (Ch1FB+Ch2FB)	Nov-19	23	33,76 $\pm$ 5,45 (26,31-47,01)	5,64 $\pm$ 3,28 (2,7-16)

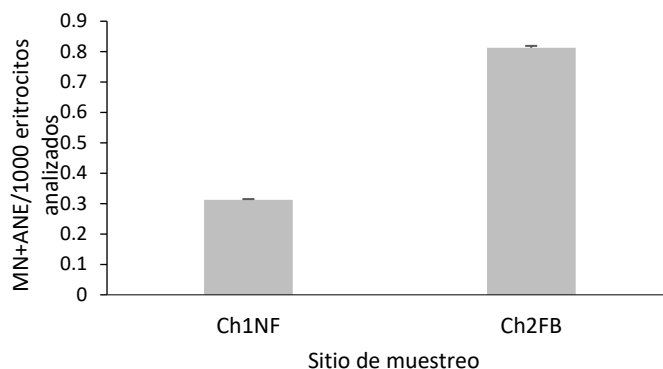


Figura 5. Frecuencia de micronúcleos más aberraciones nucleares (MN+ANE) (por 1000 células) en larvas de *Pseudis minuta*; provenientes del sitio control y un sitio forestal. Referencias: Ch1NF: charco presente en el sitio control dentro del PPQC y SY; Ch2FB: charco presente en la forestación activa de *Pinus taeda*.

DISCUSIÓN

A lo largo del estudio se registraron 17 especies de anfibios, que representan casi un 35% de las especies presentes en Uruguay. Con la excepción de *Dendropsophus minutus*, que se encuentra en los departamentos de Treinta y Tres y Cerro Largo, y que está amenazada a nivel local; el resto de las especies son comunes dentro de la fauna de anfibios del Uruguay, muestran una amplia distribución, y no se encuentran en ninguna categoría de amenaza según la última Lista Roja de anfibios y reptiles del Uruguay (Maneyro & Carreira, 2012; Carreira & Maneyro, 2015). Cabe mencionar que la especie *Phyllomedusa herringii*, habita en gran parte del territorio uruguayo, pero se encuentra asociada principalmente a ecosistemas boscosos riparios (Maneyro & Carreira, 2012). La riqueza de anfibios registrada en este estudio es menor que la reportada previamente para la Zona del Paisaje Protegido Quebrada de los cuervos (24 especies) (Prigioni *et al.*, 2011). No se registró la presencia de especies de la familia Bufonidae en ninguno de los sitios de muestreo. Trabajos previos indican la presencia de las especies *Rhinella dorbignyi*; *R. achavali*; y *Melanophryniscus sanmartini* en el área (Prigioni *et al.*, 2011). Probablemente la falta de registros se deba a la dinámica de reproducción explosiva (asociada a las fuertes precipitaciones) y al corto período larval que en general presentan estos bufónidos (Fernández, 1927; Maneyro & Carreira, 2012). Además, la especie *R. achavali* suele estar asociada a cuerpos de agua lóticos, y en el presente estudio no se muestrearon charcos con esas características. Lo mismo podría haber ocurrido con la especie *Limnomedusa macroglossa* que se reproduce en cañadas y arroyos de ambientes rocosos (Maneyro & Carreira, 2012). Otra especie como *Pleurodema bibroni* que no fue registrada en este estudio, cuenta con un registro para el área, pero del año 1926 (Prigioni *et al.*, 2011).

Riqueza y composición de anfibios

Se ha reportado que los anuros utilizan cuerpos de agua en plantaciones de pinos, incluso para la actividad reproductiva, pero con una menor riqueza y abundancia en comparación con charcos ubicados en pastizales naturales (Machado *et al.*, 2012). Contrario a lo esperado, nuestros resultados muestran que la riqueza y composición de especies entre el control y los sitios forestales fue similar. La única especie que fue detectada durante el estudio en el sitio control y que no se registró para ninguno de los sitios forestales fue *Phyllomedusa iheringii*. Si bien esta especie ha sido observada en cultivos de *Eucaliptus* (Maneyro *com. pers.*), consideramos que las plantaciones de pinos, por las características de estos árboles, serían sitios menos propicios para la especie. Como mencionamos anteriormente, *P. iheringii* está particularmente asociada a ecosistemas boscosos, y debido a esta especialización de hábitat; puede verse afectada por la pérdida de estos ambientes a causa del avance de la forestación (Langone *et al.*, 2004), lo cual podría explicar su ausencia en ambos sitios forestales. La pérdida de especies especialistas de hábitat, y la alta capacidad de persistencia de especies generalistas, se ha reportado en otras comunidades de anfibios en áreas agrícolas (Saccol *et al.*, 2017; 2022). Los resultados destacan la importancia de los anfibios como bioindicadores de la calidad ambiental, y la necesidad de elaborar planes de conservación o gestión para las poblaciones de *P. iheringii* que puedan estar presentes en sitios destinados a la forestación con pinos.

La mayoría de las especies de anuros registradas en este estudio, son generalistas, no tienen requisitos particulares de uso de hábitat; y muchas pueden habitar ambientes antropizados, así como agroecosistemas (ej. forestaciones, cultivos de arroz, de soja) (Peltzer *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2014; Saccol *et al.*, 2017, Attademo *et al.*, 2018), lo cual podría explicar la similitud en la riqueza y composición de los ensambles entre el sitio control y los sitios forestales. Otra posible explicación podría estar relacionada con las características de los sitios de muestreo. Según Dalmolin *et al.* (2022), los descriptores ambientales locales como los factores climáticos, y las características de los cuerpos de agua (ej. área del charco, profundidad del agua, oxígeno disuelto), influyen en la diversidad de larvas de anuros. En el presente estudio no encontramos diferencias significativas en la mayoría de las variables fisicoquímicas del agua analizadas entre los charcos de muestreo; y además, las características de los suelos fueron muy similares entre estos sitios; lo cual podría explicar los resultados obtenidos a nivel de la diversidad de los ensambles de anuros entre los sitios. Si bien encontramos mayores concentraciones de nitrato y fosfato en cuerpos de agua del sitio Forestal FA, lo cual es común en agroecosistemas (ej. Babini *et al.*, 2016), cabe destacar que estos nutrientes se encontraron en bajas concentraciones, considerablemente por debajo de los límites máximos establecidos de 3 mg/L de nitrato y 25 mg/L de fosfato, para la sustentabilidad de la vida acuática (USEPA, 1997; Burton & Pitt, 2001). En

trabajos futuros, sería interesante analizar los paisajes que rodean los distintos sitios de muestreo, y observar su grado de perturbación, ya que, si estos paisajes están bien conservados, podrían ofrecer condiciones favorables para el mantenimiento de las poblaciones a nivel local y de esta forma hacer homogénea la composición de especies a una escala regional (Dos santos *et al.*, 2021).

Índice de Condición Corporal y parámetros de las células sanguíneas en *Pseudis minuta*

Los efectos de la forestación tampoco fueron evidentes sobre el BCI de los individuos adultos de *Pseudis minuta*. Un estudio reciente donde se comparó la condición corporal de siete especies de anuros del Uruguay, entre plantaciones forestales de pinos y eucaliptos, con ecosistemas naturales (campo y bosque ribereño); solo encontró diferencias para una especie, *Leptodactylus luctator* (Maneyro & Carreira, 2023). Teniendo en cuenta este aspecto sería recomendable extender el análisis hacia otras especies de anuros que componen los ensambles presentes en los sitios de estudio; así como aumentar el tamaño de muestra (número de individuos), con el fin de detectar diferencias estadísticas más sutiles en la condición corporal de los individuos.

Detectamos la presencia de MN y ANE; en larvas de *P. minuta* provenientes del charco presente en la forestación activa de Pinos (sitio FB), evidenciando los efectos a nivel celular de la actividad forestal. En estas larvas la frecuencia de MN+ANE fue significativamente mayor que en las larvas del sitio control. La presencia de núcleos aberrantes complementa el análisis de MN en evaluaciones de genotoxicidad (Cavas & Ergene-Gözükar, 2005); y la inducción en conjunto de ambos tipos de alteraciones en los eritrocitos puede provocar daño celular y la muerte (Barni *et al.*, 2007). La única aberración nuclear observada en los eritrocitos de larvas de *P. minuta* fue núcleo con muescas, anomalía asociada principalmente a citotoxicidad (Bolgnesi *et al.*, 2006). Estos resultados estarían indicando la presencia de agentes geno-citotóxicos en el charco del sitio forestal. En general, la actividad forestal implica un uso de agroquímicos restringido a las primeras etapas del cultivo, aunque muchas veces el manejo puede requerir de re-aplicaciones en etapas más tardías. La forestación al momento de estudio tenía 9 años; pero como desconocemos su historial de manejo, no podemos descartar el efecto residual de alguno de los agroquímicos (o sus metabolitos) que hayan sido utilizados en el campo; o el hecho de que puedan llegar contaminantes químicos por escorrentía desde otros sitios agrícolas. En este sentido, cabe mencionar que, si bien se destaca la presencia de ambientes naturales rodeando a la forestación de estudio, identificamos dos cultivos forestales de *Eucalyptus sp*, uno ubicado a 2.7 km hacia el Sur, y otro a 3.5 km hacia el Norte. Esta última forestación es más reciente, y se ubica en la cabecera de la cuenca, aguas arriba, lo cual favorecería el escurrimiento del agua hacia la forestación de estudio.

Finalmente, cabe destacar que la mayoría de los estudios se focalizan en evaluar los efectos de la actividad agrícola y forestal a nivel de los ensambles de anfibios (Machado *et al.* 2012; Saccol *et al.* 2017, Gangenova *et al.*, 2018). Trabajos previos han reportado la similitud en la riqueza de especies de anfibios entre distintos tipos de alteración del hábitat (silvicultura, agricultura, áreas urbanas) y sitios naturales (Dos santos *et al.*, 2021; Decena *et al.* 2020). Recientemente, se ha demostrado que los cambios producidos en la química del suelo a causa de las plantaciones de pinos (alteraciones en porcentaje de materia orgánica, carbono orgánico y nitrógeno total), afectan el crecimiento, desarrollo y estrés oxidativo en larvas de dos especies de anuros (Schvezov *et al.*, 2023). Teniendo en cuenta lo antes mencionado y los resultados obtenidos en este capítulo, destacamos la importancia de desarrollar más estudios que evalúen los posibles efectos de la actividad forestal con pinos sobre los anfibios a nivel poblacional, celular, y fisiológico, incluyendo el uso de otros biomarcadores como indicadores enzimáticos de estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayres, M., Júnior Aires, M., Ayres, D. L., & Santos, A. D. A. S. (2007). Bio Estat 5.0: aplicações estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas. In *Bio Estat 5.0: aplicações estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas* (pp. 364-364).
- Afonso, L. G., & Eterovick, P. C. (2007). Spatial and temporal distribution of breeding anurans in streams in southeastern Brazil. *Journal of Natural History*, 41(13-16), 949-963.
- Allingham, S. M. (2020). The effects of habitat alteration on anuran diversity and assemblages on Mount Mulanje, Malawi. *African Journal of Wildlife Research*, 50(1), 20-35.
- Attademo, A. M., Lorenzón, R. E., Peltzer, P., & Lajmanovich, R. C. (2018). Diversity of anurans in rice fields under organic and conventional management in Santa Fe province, Argentina. *Herpetological Review*, 49(4), 632–635.
- Babini, M. S., de Lourdes Bionda, C., 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 118-125.
- Babini, M. S., Bionda, C. D. L., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2016). Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-14.
- Baeza, S., & Paruelo, J. M. (2020). Land use/land cover change (2000–2014) in the Rio de la Plata grasslands: an analysis based on MODIS NDVI time series. *Remote sensing*, 12(3), 381.
- Băncilă, R. I., Hartel, T., Plăiașu, R., Smets, J., & Cogălniceanu, D. (2010). Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amphibia-Reptilia*, 31(4), 558-562.

- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., & Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 45-54.
- Bastazini, C. V., Munduruca, J. F., Rocha, P. L. B., & Napoli, M. F. (2007). Which environmental variables better explain changes in anuran community composition? A case study in the restinga of Mata de São João, Bahia, Brazil. *Herpetologica*, 63(4), 459-471.
- Becker, C. G., Fonseca, C. R., Haddad, C. F. B., Batista, R. F., & Prado, P. I. (2007). Habitat split and the global decline of amphibians. *Science*, 318(5857), 1775-1777.
- Benvindo-Souza, M., Oliveira, E. A. S., Assis, R. A., Santos, C. G. A., Borges, R. E., e Silva, D. D. M., & de Souza Santos, L. R. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240, 124910.
- Bionda, C. D. L., Babini, S., Martino, A. L., Salas, N. E., & Lajmanovich, R. C. (2018). Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad *Rhinella arenarum* (anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation*, 14, e00398.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., & Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic toxicology*, 78, S93-S98. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.02.015.
- Borcard, D., Gillet, F., & Legendre, P. (2011). *Numerical ecology with R* (Vol. 2, p. 688). New York: springer.
- Burton Jr, G. A., & Pitt, R. (2001). *Stormwater effects handbook: A toolbox for watershed managers, scientists, and engineers*. CRC Press.
- Bustamante, R. O., & Simonetti, J. A. (2005). Is *Pinus radiata* invading the native vegetation in central Chile? Demographic responses in a fragmented forest. *Biological Invasions*, 7, 243-249.
- Caldwell, J. P., & Shepard, D. B. (2007). Calling site fidelity and call structure of a Neotropical toad, *Rhinella ocellata* (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 41(4), 611-621.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123-2136.
- Carreira, S., & Maneyro, R. (2015). *Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay: Una Evaluación del Estado de Conservación de la Herpetofauna de Uruguay sobre la Base de los Criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza*. MVOTMA, Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, Dirección Nacional de Medio Ambiente.
- Carreira, S., & Maneyro, R. (Eds.). (2019). *Libro rojo de los anfibios y reptiles del Uruguay: biología y conservación de los anfibios y reptiles en peligro de extinción a nivel nacional*. MVOTMA, Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, Dirección Nacional de Medio Ambiente.

- Çavaş, T., & Ergene-Gözükara, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology*, 74(3), 264-271.
- Cayuela, H., Lambrey, J., Vacher, J. P., & Miaud, C. (2015). Highlighting the effects of land-use change on a threatened amphibian in a human-dominated landscape. *Population ecology*, 57, 433-443.
- Chao, A., & Jost, L. (2012). Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*, 93(12), 2533-2547.
- Collins, J. P., Crump, M. L., & Lovejoy III, T. E. (2009). *Extinction in our times: global amphibian decline*. Oxford University Press.
- Colwell, R. K., & Coddington, J. A. (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 345(1311), 101-118.
- Cushman, S. A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological conservation*, 128(2), 231-240.
- Dalmolin, D. A., dos Santos, T. G., Tozetti, A. M., & Pereira, M. J. R. (2022). Environmental descriptors and reproductive modes drive multiple facets of tadpole diversity in subtropical temporary ponds. *Aquatic Ecology*, 56(4), 951-971.
- Decena, S. C. P., Avorque, C. A., Decena, I. C. P., Asis, P. D., & Pacle, B. (2020). Impact of habitat alteration on amphibian diversity and species composition in a lowland tropical rainforest in Northeastern Leyte, Philippines. *Scientific reports*, 10(1), 10547.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de transferencia InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dos Santos, R. C., Dalmolin, D. A., Brum, D., Veronez, M. R., Lucas, E. M., & Tozetti, A. M. (2021). Association between land use and composition of amphibian species in temperate Brazilian forest remnants. *bioRxiv*, 2021-02.
- Eterovick, P. C., Sloss, B. L., Scalzo, J. A., & Alford, R. A. (2016). Isolated frogs in a crowded world: Effects of human-caused habitat loss on frog heterozygosity and fluctuating asymmetry. *Biological Conservation*, 195, 52-59.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
- Fernández, K. (1927). Sobre la biología y reproducción de batracios argentinos. Segunda parte. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba*, 29, 271-328.
- Figueiredo, G. D. T., Storti, L. F., Lourenco-De-Moraes, R., Shibatta, O. A., & ANJOS, L. D. (2019). Influence of microhabitat on the richness of anuran species: a case study of different landscapes in the Atlantic Forest of southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.
- Fonseca, C. R., Ganade, G., Baldissera, R., Becker, C. G., Boelter, C. R., Brescovit, A. D., ... & Vieira, E. M. (2009). Towards an ecologically-sustainable forestry in the Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 142(6), 1209-1219.

- Gangenova, E., Zurita, G. A., & Marangoni, F. (2018). Changes to anuran diversity following forest replacement by tree plantations in the southern Atlantic forest of Argentina. *Forest ecology and management*, 424, 529-535.
- 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.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.
- Heyer, R., Donnelly, M. A., Foster, M., & Mcdiarmid, R. (Eds.). (2014). *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution.
- Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2016). iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution*, 7(12), 1451-1456.
- INIA. (2022). Estación, Banco de datos agroclimáticos 1965–2018. Estación Treinta y Tres, Uruguay. Disponible en: <http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico> [último acceso mayo, 2023].
- IUCN. (2023). *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>.
- Jackson, R. B., Banner, J. L., Jobbágy, E. G., Pockman, W. T., & Wall, D. H. (2002). Ecosystem carbon loss with woody plant invasion of grasslands. *Nature*, 418(6898), 623-626.
- Jobbágy, E. G., Vasallo, M., Farley, K. A., Pineiro, G., Garbulsky, M. F., Noretto, M. D., ... & Paruelo, J. M. (2006). Forestación en pastizales: hacia una visión integral de sus oportunidades y costos ecológicos. *Agrociencia Uruguay*, 10(2), 109-124.
- Keller, A., Rödel, M. O., Linsenmair, K. E., & Grafe, T. U. (2009). The importance of environmental heterogeneity for species diversity and assemblage structure in Bornean stream frogs. *Journal of Animal Ecology*, 305-314.
- Kellermann, A. G., Scalón-Luchese, M., Vieira, R. C., Brack, I. V., & Verrastro, L. (2021). Local extinction of *Tropidurus catalanensis* caused by plantation forestry in the Pampas of Brazil. *Herpetological Conservation and Biology*, 16(2), 295-302.
- Knapp, S. M., Haas, C. A., Harpole, D. N., & Kirkpatrick, R. L. (2003). Initial effects of clearcutting and alternative silvicultural practices on terrestrial salamander abundance. *Conservation Biology*, 17(3), 752-762.
- Kwet, A., Lavilla, E., Faivovich, J., & Langone, J. (2004). *Pseudis minuta*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55903A11385301. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55903A11385301.en>. Accessed on 17 November 2023.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Bassó, A., & Lorenzatti, E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the

- herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 7-12.
- Langone, J. A., Maneyro, R., & Arrieta, D. (2004). Present knowledge of the status of amphibian conservation in Uruguay. *Collected DAPTF Working Group Reports: Ten Years On. Department of Biological Sciences, The Open University, Walton Hall*, 83-87.
- Le Maitre, D. C., Versfeld, D. B., & Chapman, R. A. (2000). Impact of invading alien plants on surface water resources in South Africa: A preliminary assessment.
- Machado, I. F., Moreira, L. F., & Maltchik, L. (2012). Effects of pine invasion on anurans assemblage in southern Brazil coastal ponds. *Amphibia-Reptilia*, 33(2), 227-237.
- Magurran, A. E., & McGill, B. J. (2011). *Biological Diversity*. Oxford University Press, New York.
- Maneyro, R., & Carreira, S. (2012). Guía de anfibios del Uruguay. Ediciones de la fuga. *Coleccion Ciencia Amiga Press, Uy*. 207pp.
- Maneyro, R. & S. Carreira. (2023). Respuesta de un ensamble de anfibios a la actividad forestal. En: Brazeiro, A (Ed.). Biodiversidad en paisajes forestados de Uruguay. 67 - 86 pp. *Comisión Sectorial de Investigación Científica (UdelaR), Uruguay*.
- Margolin, B. H., Collings, B. J., & Mason, J. M. (1983). Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments with binomial responses. *Environmental mutagenesis*, 5(5), 705-716.
- Means, D. B., Palis, J. G., & Baggett, M. (1996). Effects of slash pine silviculture on a Florida population of flatwoods salamander. *Conservation Biology*, 10(2), 426-437.
- Meintières, S., Biola, A., Pallardy, M., & Marzin, D. (2001). Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. *Mutagenesis*, 16(3), 243-250.
- Metcalf, J. L. (1989). Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environmental pollution*, 60(1-2), 101-139.
- MGAP-DGF. (2021). Cartografía Nacional Forestal 2021. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección General Forestal. Montevideo, Uruguay. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/resultados-cartografia-forestal-2021>. [último acceso mayo, 2022].
- Moreno, C.E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. Zaragoza: M&T-Sociedad Entomológica Aragonesa. 84 pp.
- Moreira, L. F. B., Knauth, D. S., & Maltchik, L. (2014). Checklist of amphibians in a rice paddy area in the Uruguayan savanna, southern Brazil. *Check List*, 10(5), 1014-1019.
- Moulton, C. A. (1996). The use of PVC pipes to capture hylid frogs. *Herpetol. Rev.*, 27, 186-187.
- Mueller-Dombois, D., & Ellenberg, H. (1974). Vegetation types: a consideration of available methods and their suitability for various purposes.
- Nosetto, M. D., Jobbágy, E. G., & Paruelo, J. M. (2005). Land-use change and water losses: the case of grassland afforestation across a soil textural gradient in central Argentina. *Global Change Biology*, 11(7), 1101-1117.

- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., ... & Imports, M. A. S. S. (2019). Package 'vegan'. *Community ecology package, version*, 2(9).
- Panario, D., & Gutiérrez, O. (2007). La política forestal industrial del estado uruguayo. *Política y Pasteras en el Rio Uruguay: Medio Ambiente, Modelos Productivos y Movimiento Social*, 1-9.
- Parris, K. M., & Lindenmayer, D. B. (2004). Evidence that creation of a *Pinus radiata* plantation in south-eastern Australia has reduced habitat for frogs. *Acta Oecologica*, 25(1-2), 93-101.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., & Beltzer, A. H. (2006). Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. *Marine, Freshwater, and Wetlands Biodiversity Conservation*, 131-145.
- Prigioni, C., Borteiro, C., & Kolenc, F. (2011). Amphibia and Reptilia, Quebrada de los Cuervos, Departamento de Treinta y Tres, Uruguay. *Check Listé*, 7(6), 763-767.
- Proyecto MapBiomias Pampa Trinacional. (2023). Colección 2.0 de los Mapas Anuales de Cobertura y Uso del Suelo en Pampa Trinacional. Último acceso: 25 de octubre. <https://pampa.mapbiomas.org/>.
- R Core Team. (2022). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Accessed on 20 june 2023.
- Richardson, D. M., Williams, P. A., & Hobbs, R. J. (1994). Pine invasions in the Southern Hemisphere: determinants of spread and invadability. *Journal of biogeography*, 511-527.
- Saccol, S. D. S. A., Bolzan, A. M. R., & Gomes dos Santos, T. (2017). In the shadow of trees: does eucalyptus afforestation reduce herpetofaunal diversity in Southern Brazil?. *South American Journal of Herpetology*, 12(1), 42-56.
- Saccol, S. D. S. A., Cavalheiro Dias Ucha, J. L., Madalozzo, B., Zanini Cechin, S., & Gomes dos Santos, T. (2022). Influence of land use on the diversity of pond-breeding anurans in South Brazilian grasslands. *Biodiversity and Conservation*, 1-17.
- Schvezov, N., Caffetti, J., Silva, C., Boeris, J., Baldo, D., & Lajmanovich, R. (2023). Impact of soil from monoculture pine plantations on two anuran species from the Atlantic Forest: *Odontophrynus reigi* and *Leptodactylus luctator*. *Science of The Total Environment*, 869, 161769.
- Silva, F. R., Oliveira, T. A., Gibbs, J. P., & Rossa-Feres, D. C. (2012). An experimental assessment of landscape configuration effects on frog and toad abundance and diversity in tropical agro-savannah landscapes of southeastern Brazil. *Landscape ecology*, 27, 87-96.
- Smith, M. A., & Green, D. M. (2005). Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations?. *Ecography*, 28(1), 110-128.
- SNAP. (2010). Plan de Manejo Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos. Proyecto Fortalecimiento del Proceso de Implementación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (URU/05/001). Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio->

ambiente/comunicacion/publicaciones/plan-manejo-paisaje-prottegido-quebrada-cuervos-sierras-del-yerbal. [último acceso, mayo 2022].

- Stebbins, R. C., & Cohen, N. W. (1995). *A Natural history of amphibians*. Princeton University Press.
- USEPA. (1997). Volunteer Stream Monitoring: A Methods Manual. EPA 841-B-97-003. Office of Water 4503F, Washington, 227 pp. Accessible at: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/stream.pdf>.
- Veldman, J. W., Overbeck, G. E., Negreiros, D., Mahy, G., Le Stradic, S., Fernandes, G. W., ... & Bond, W. J. (2015). Tyranny of trees in grassy biomes. *Science*, 347(6221), 484-485.
- Wells, K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press.
- Zalba, S. M., Cuevas, Y. A., & Devillalobos, A. E. (2009). Lecciones aprendidas durante siete años de control de pinos invasores en pastizales naturales. En: Cazzaniga, N.J. & Arelovich, H.M. (eds.). *Ambientes y recursos naturales del sudoeste bonaerense: producción, contaminación y conservación*, pp. 325-340. Editorial de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

CAPÍTULO 2. Toxicidad de sedimentos en charcos asociada a la aplicación de agroquímicos en un sitio forestal: su efecto sobre larvas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae).

INTRODUCCIÓN

La transformación de grandes áreas de pastizales naturales en monocultivos forestales es común en América del Sur (Nosetto, *et al.*, 2005; Fonseca *et al.* 2009; Veldman *et al.* 2015; Baeza & Paruelo, 2020). En Uruguay, la actividad forestal ha crecido sostenidamente en los últimos años, y las plantaciones (principalmente de eucaliptus y pino), superan el millón de hectáreas (MGAP-DGF, 2021). La expansión de la forestación fue acompañada de un incremento importante en el consumo de agroquímicos (AQ), que pasó de 1.762 toneladas en 1990 a una media de 13.000 toneladas anuales entre el 2015-2019 (Cárcamo, 2020). Esto puede impactar negativamente en el ambiente, ya que distintos pesticidas y sus metabolitos, son frecuentemente detectados contaminando suelos y cuerpos de agua superficiales (Gilliom *et al.*, 2006; De Liguoro *et al.*, 2014; Nardo *et al.*, 2015; Soutullo *et al.*, 2020); a donde suelen llegar por escorrentía (Martino *et al.*, 2008). Además, varios productos químicos tienden a acumularse en los sedimentos, donde pueden provocar toxicidad para organismos acuáticos (Fojut *et al.*, 2013); motivo por el cual el problema de la contaminación del agua adquiere una nueva dimensión (Lajmanovich & Peltzer, 2008). Los mayores niveles de contaminantes se observan en las capas más superficiales de sedimentos donde se concentra la materia orgánica (Hoffman *et al.*, 2003).

Los anfibios anuros que habitan agroecosistemas están particularmente expuestos a este tipo de contaminación, ya que suelen utilizar cuerpos de agua superficiales para su desarrollo embrionario y larval (Wells, 2007). Por este motivo, y por su alta sensibilidad (a causa principalmente de la presencia de una piel delgada y permeable) (Wells, 2007), son un buen modelo biológico para estudiar el efecto de los AQ. Generalmente, estos efectos se abordan mediante el uso de biomarcadores, que son respuestas biológicas a distintos niveles, desencadenadas por la exposición a contaminantes (Gupta, 2014). En estudios ecotoxicológicos con larvas de anfibios, para detectar efectos a nivel individual, es común el uso de biomarcadores morfológicos (ej. longitud corporal, tasa de desarrollo, crecimiento, presencia de anomalías morfológicas), mientras que para evaluar el efecto geno-citotóxico de los contaminantes se utilizan biomarcadores citogenéticos como la presencia de micronúcleos (MN) y de otras aberraciones nucleares en los eritrocitos (ANE) (Lajmanovich *et al.*, 2021). Se ha demostrado, mediante el uso de estos biomarcadores, que diversos AQ que pueden estar presentes en los sistemas acuáticos producen efectos genotóxicos, y afectan a los puntos finales biológicos de larvas de anuros expuestas (Natale *et al.*, 2018; Curi *et al.*, 2019; Pérez-Iglesias *et al.*, 2020; Samojeden *et al.*, 2022).

Pese a que la silvicultura continúa expandiéndose en el país, son escasos los estudios que evalúan el efecto de esta actividad sobre los anfibios autóctonos (Maneyro & Carreira, 2023). Recientemente se reportó el efecto tóxico y genotóxico, del S-metolaclo, un herbicida ampliamente utilizado en el manejo de las plantaciones

forestales, sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Pereira *et al.*, 2024). Como se mencionó anteriormente, los AQ pueden llegar a los cuerpos de agua utilizados por los anfibios y acumularse en los sedimentos. Esto afecta particularmente a las larvas de especies con hábitos bentónicos, que están en contacto con el sedimento, ya que se alimentan en o cerca del fondo de los cuerpos de agua (McDiarmid & Altig, 1999). Existen pruebas de toxicidad de sedimentos estandarizadas para anfibios, que resultan claves para evaluar si los contaminantes químicos en los sedimentos representan un riesgo para estos organismos (USEPA 1996; ASTM, 2022). No obstante, los estudios que involucran el uso de sedimentos contaminados para evaluar sus potenciales efectos sobre larvas de anuros en la región son escasos (Peltzer *et al.*, 2013; Henao Muñoz *et al.*, 2015; Curi *et al.*, 2017; Gripp *et al.*, 2017; Sansiñena *et al.*, 2018). Los experimentos de mesocosmos al aire libre han resultado ser efectivos para estudiar la toxicidad de sedimentos sobre larvas de anuros (Peltzer *et al.*, 2013; Sansiñena *et al.*, 2018). Los mesocosmos ofrecen condiciones ecológicas más realistas, considerándose un nivel intermedio entre los ensayos de laboratorio y de campo, ya que minimizan los riesgos de simplificar en exceso el entorno; y de las grandes variaciones entre réplicas (Boone *et al.*, 2005). Su principal ventaja es que permiten estudiar los efectos de los contaminantes en un contexto ecológicamente relevante (Boone *et al.*, 2005).

El objetivo de este estudio fue evaluar la potencial toxicidad de los sedimentos de charcos presentes en un sitio forestal bajo manejo con AQ, utilizando a *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Anura: Leptodactylidae), como especie bioindicadora.

Hipótesis:

Los sedimentos de charcos ubicados en sitios bajo actividad forestal mantienen una toxicidad potencial asociada con la aplicación de agroquímicos.

Predicciones:

1. Las larvas de *P. gracilis* expuestas a sedimentos provenientes de los sitios forestales, presentarán una mayor ocurrencia de anormalidades morfológicas y de daños a nivel genético, y una menor tasa de desarrollo y crecimiento en relación con las larvas expuestas a sedimentos del sitio control.
2. Los metamorfos de *P. gracilis* provenientes de los tratamientos con sedimentos de los sitios forestales; presentarán una peor condición corporal, en relación con los metamorfos del sitio control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en un predio forestal (F) de 1500 ha, ubicado sobre la ruta 8 en el Departamento de Treinta y Tres, Uruguay. Allí se plantó recientemente

Eucalyptus grandis y *Eucalyptus dunnii*. En esta forestación fueron seleccionados dos cuerpos de agua para monitoreo, uno permanente (Ch2F, área 835 m²); y otro temporal (Ch6F, área 569 m²) (Figura 1B y C). El plan de manejo en las distintas etapas de la plantación incluyó el uso de los herbicidas Glifosato; S-metolacoloro; Sulfentrazone; Haloxyfop R-metil, e Isoxaflutole; y del insecticida Fipronil (por más información del plan de Manejo del área ver ANEXO II). Por otra parte, se seleccionó otro cuerpo de agua en un sitio control (ChNF) (32,90579°S; 54,44522°W) dentro del Paisaje Protegido Quebrada de los cuervos y Sierras del Yermal (PPQQ y SY) (Figura 1A), ubicado a unos pocos kilómetros del sitio F. El sitio control (NF) es una zona de pastizal natural, excluida de actividad ganadera y antrópica. Se tomaron tres muestras de suelo compuestas por charco (cada una formada por 10 sub-muestras), utilizando una caladora a cinco cm de profundidad, con el fin de determinar su porcentaje de materia orgánica (% MO).



Figura 1. Sitios de estudio. A. Charco control dentro del Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos y Sierras del Yermal (ChNF). B. Charco permanente dentro de la forestal (Ch2F). C. Charco temporal dentro de la forestal (Ch6F).

Muestreo de sedimentos

Se extrajeron sedimentos de los charcos presentes en F y NF, a 10 cm de profundidad utilizando un corer, para disminuir la pérdida de capas superficiales de sedimentos donde se concentra la materia orgánica que contiene los mayores niveles de contaminantes (Hoffman *et al.*, 2003). Considerando los tiempos de aplicación y los tiempos de vida media de los AQ utilizados en el manejo de la forestación, las extracciones de sedimentos en el sitio F se realizaron a los 15, 30 y 90 días posteriores a la primera aplicación (T1, T2 y T3, respectivamente). El muestreo de sedimentos fue compuesto y estandarizado (MVOTMA, 2002). Se tomaron 10 muestras por charco, compuestas cada una por 3 sub-muestras. Las muestras se acondicionaron en bolsas estériles dentro de bolsas oscuras, y fueron transportadas en conservadoras refrigeradas hasta el laboratorio, donde se guardaron en el freezer hasta el comienzo de los experimentos (Hoffman *et al.*, 2003). En el charco control la extracción de sedimentos se hizo una única vez (en la salida correspondiente a T2), y se extrajeron submuestras de estos sedimentos (aprox. 1 kg) para analizar la presencia de AQ (Peltzer *et al.*, 2013).

En cada salida de campo se registró la calidad del agua de los charcos en F y NF, registrando temperatura (°C), conductividad ($\mu\text{Ss-1}$), pH, y oxígeno disuelto (mg L^{-1}), utilizando un multiparámetro HACH Sension 156; así como la concentración de nitrato amonio y fosfato, disueltos en el agua con un colorímetro Lamotte (modelo SMART3) y kits comerciales. Además, registramos las especies de anfibios que fueron detectadas en estos sitios durante los muestreos de sedimentos.

La especie de prueba

Physalaemus gracilis (Anura: Leptodactylidae), se encuentra presente en Brasil (estados de Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul), Argentina (provincia de Misiones), y en gran parte del territorio uruguayo (principalmente al sur del Río Negro) (Maneyro & Carreira, 2012). Su presencia está registrada para el sitio de estudio. En Uruguay ocupa diversos ambientes como praderas, bañados, y se caracteriza por coexistir de manera relativamente exitosa con la urbanización (Maneyro & Carreira, 2012). Se reproduce en los meses cálidos, principalmente en cuerpos de agua lénticos con mucha vegetación flotante; y los huevos son depositados en nidos de espuma (Maneyro & Carreira, 2012). Las larvas presentan hábitos bentónicos; y su fórmula dentaria es: 2(2) / 3(1) (Santos, 2022). Es una especie que no se encuentra amenazada a escala local (Carreira & Maneyro, 2015), ni global (Lavilla *et al.*, 2010). Trabajos previos han utilizado a *P. gracilis* como organismo de prueba en estudios ecotoxicológicos (ej. Vanzetto *et al.*, 2019; Herek *et al.*, 2020; 2021; Rutkoski *et al.*, 2020; 2021).

Colecta y mantenimiento de larvas de *Physalaemus gracilis*

Las larvas de *P. gracilis* en estadio temprano de desarrollo se colectaron manualmente de un sitio sin actividad agrícola, ubicado en la localidad de Melilla, Montevideo, Uruguay. Fueron trasladadas al laboratorio y se aclimataron durante una semana en acuarios con agua de grifo filtrada (filtro PSA, modelo senior 3), y declorada; con aireación artificial constante. Se mantuvo un fotoperíodo de 12:12 horas luz/oscuridad; y una temperatura ambiente de $22\pm 2^\circ\text{C}$ (Junges *et al.*, 2012; Lajmanovich *et al.*, 2014). Las larvas fueron alimentadas “*ad libitum*” hasta el comienzo del experimento de mesocosmos con lechuga hervida (*Lactuca sativa*) (Junges *et al.*, 2012; Lajmanovich *et al.*, 2014).

Diseño experimental: experimentos de mesocosmos

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los protocolos de experimentación aprobados por la Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (protocolos número 474 y 684). Para analizar el efecto del tratamiento de sedimentos en las respuestas biológicas

de las larvas de *P. gracilis*, se realizaron experimentos de mesocosmos al aire libre entre marzo-mayo del 2021; siguiendo los protocolos de exposición a sedimentos para anfibios (USEPA, 1996; Peltzer *et al.*, 2013), con alguna modificación. Las respuestas biológicas evaluadas fueron: mortalidad, crecimiento, desarrollo, anormalidades morfológicas (a nivel del cuerpo, disco oral, cola e intestino), parámetros de las células sanguíneas (MN y ANE), y condición corporal de metamorfos.

Los mesocosmos consistieron en acuarios de vidrio con una capacidad de 15,6 litros (25 cm largo, 25 cm de ancho, 25 cm de profundidad). Antes del inicio del experimento, se extrajeron sub-muestras de cada tratamiento de sedimentos del sitio F (aprox. 1 kg) para determinar la presencia y concentraciones de los AQ utilizados. Los sedimentos congelados se colocaron en la base de los acuarios, y luego se agregó agua filtrada previamente declorada. La proporción de sedimento/agua fue de 1:4 (4 cm de sedimento (2 kg aprox.), y columna de 16 cm de agua (10 L aprox.)) (Figura 2A). Los acuarios se cubrieron con una malla móvil de 2x2 mm para evitar la depredación y oviposición de insectos (Figura 2B) (Peltzer *et al.*, 2013; Curi *et al.*, 2017). Los mesocosmos se dejaron en reposo durante 48 h, antes de comenzar con el experimento. Cada tratamiento de sedimentos y el control se hizo por triplicado, y en cada acuario se colocaron 32 larvas de *P. gracilis*, en estadios GS27-29 (Gosner, 1960), para que completen allí su desarrollo (día experimental 1, 23 de marzo). La distribución de los mesocosmos fue completamente al azar. El tamaño promedio inicial de las larvas (desde la punta del hocico hasta la punta de la cola) fue de 20.9 ± 2.9 (14.1-28.3) mm; y la masa húmeda fue de 0.09 ± 0.03 (0.03-0.17) g. Las larvas fueron alimentadas con lechuga hervida cada dos días.

Durante el transcurso del experimento, las densidades iniciales de larvas fueron disminuyendo, ya que se extrajeron dos larvas por réplica cada semana para el análisis de puntos finales biológicos; y dos larvas por réplica a las 168 h para los análisis de genotoxicidad (Peltzer *et al.*, 2013). Desde el día experimental 1, y todas las semanas previo a la extracción de individuos se determinó la calidad del agua por la mañana (10:00 h), como fue detallado anteriormente. La extracción de larvas para el análisis de puntos finales biológicos se extendió hasta el día experimental número 36 (5 semanas de exposición); ya que en uno de los tratamientos no se alcanzó el número mínimo de individuos ($n=6$) a estudiar. A causa de la metamorfosis asincrónica observada en la especie de estudio, las larvas extraídas al azar que superaran el estadio de desarrollo 40 de Gosner (1960), no fueron consideradas para el análisis de puntos finales biológicos, para evitar cambios morfológicos asociados con la cercanía al clímax metamórfico. El experimento se dio por finalizado el día 4 de mayo (43 días de duración), cuando el clima se volvió más frío, y en dos de los tratamientos de sedimentos, el porcentaje de individuos vivos se encontró por debajo del 5%. En todas las larvas sobrevivientes se aplicó la eutanasia utilizando xilocaína por vía tópica; luego se fijaron en formol al

10%, y fueron depositadas en la Colección Zoología de Vertebrados de la Facultad de Ciencias (ZVCB); siguiendo los protocolos experimentales aprobados por la CEUA, como se mencionó anteriormente.



Figura 2. Imagen de los mesocosmos. A. Proporción agua y sedimentos en cada mesocosmos. B. Mesocosmos cubiertos con malla móvil.

Respuestas biológicas

Mortalidad, desarrollo y crecimiento.

Los mesocosmos se controlaron diariamente para detectar la presencia de larvas muertas. Los individuos muertos, permanecían inmóviles sobre el sedimento, y presentaban cambios en su coloración y apariencia. Estas larvas fueron removidas y fijadas en formol al 10% en forma inmediata. El primer día del experimento, se extrajeron al azar dos larvas por acuario ($n=6$ por tratamiento), utilizando redes de mano, y se determinó la masa (M) húmeda en g, utilizando una balanza digital Radwag WTB 2000 (0.01 g de precisión). Esas larvas fueron fotografiadas para determinar posteriormente su longitud corporal, y luego se devolvieron a su correspondiente tratamiento. Una semana después, se volvieron a extraer al azar dos larvas por cada réplica de tratamiento de sedimento (Peltzer *et al.*, 2013); y esto se repitió una vez por semana a lo largo del experimento. Las larvas, fueron pesadas inmediatamente (masa húmeda) y se fotografiaron, luego fueron sacrificadas, y se colocaron en viales de Eppendorf con formol al 10% para medir los puntos finales de desarrollo, crecimiento y malformaciones (Peltzer *et al.*, 2013). A través de las fotografías, utilizando el software Micrometrics® SE Premium; se registró la longitud del cuerpo (BL) en mm. Para determinar el estadio de desarrollo de las larvas según Gosner (1960) se utilizó una lupa estereoscópica binocular Nikon SM800. Todas estas larvas fueron depositadas en la colección científica ya mencionada.

Anormalidades morfológicas

Cada larva preservada se analizó en búsqueda de anomalías morfológicas, utilizando una lupa estereoscópica binocular Nikon SM800. Las anomalías fueron

registradas utilizando una cámara digital en color TrueDepth, de 12 MP marca Apple; y se clasificaron en las siguientes categorías: 1. anomalías corporales (ej. cuerpo hinchado; cuerpo cóncavo ventralmente); 2. anomalías en el disco oral (ej. pérdida de queratodontes; alteraciones en el pico córneo); 3. anomalías en los ojos (ej. microftalmia); 4. anomalías en la cola (ej. flexión de la cola; cola rígida); y 4. anomalías intestinales (ej. intestino desviado; enrollamiento anormal del intestino) (Krishnamurthy & Smith, 2011; Peltzer *et al.*, 2013; 2021; Curi *et al.*, 2017; Sansiñena *et al.*, 2018; Pollo *et al.*, 2019; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022).

Parámetros de las células sanguíneas (MN y ANE)

A las 168 h, luego de comenzado el experimento, fueron colectadas al azar seis larvas de cada tratamiento de sedimentos, para la medición de parámetros de las células sanguíneas (Peltzer *et al.*, 2013). Las larvas fueron sacrificadas, luego se les extrajo sangre utilizando capilares heparinizados, y se prepararon frotis por duplicado que se tiñeron aplicando la técnica May-Grünwald Giemsa (Barni *et al.*, 2007; Lajmanovich *et al.*, 2014). Se determinó la frecuencia de MN y de ANE en 1000 eritrocitos por cada larva utilizando un microscopio óptico Olympus BX41, con una magnificación de 1000x (Lajmanovich *et al.*, 2014). Se tomaron fotografías de los frotis con una cámara Evolution vf cooled color, y las imágenes se procesaron con el Software ImageJ (National Institute of Health, USA). Los MN fueron identificados siguiendo los criterios de Fenech (2000) y Meintières *et al.* (2001); y las distintas ANE se clasificaron según los criterios de Carrasco (1990), Guilherme *et al.* (2008), Lajmanovich *et al.* (2014, 2015); Josende *et al.* (2015); y Pereira *et al.* (2024). La frecuencia de ANE se expresó como el valor medio (‰) de la suma de todos los tipos de aberraciones individuales observadas (Lajmanovich *et al.*, 2014).

Metamorfos

Luego de alcanzar el estadio GS42 (caracterizado por la aparición de los miembros anteriores), los metamorfos de cada tratamiento de sedimentos, se controlaron todos los días hasta que completaron el proceso de metamorfosis (Peltzer *et al.*, 2013). En todos los casos, se registró el tiempo transcurrido hasta el fin de la metamorfosis (estadio GS 46). Los individuos fueron medidos desde la punta del hocico hasta la cloaca (LHC en mm), utilizando un calibre digital marca KAMASA® de 0.01 g de precisión, y se determinó su masa en g (0.01 g de precisión). Los metamorfos fueron eutanasiados; se fijaron en formol al 10%, y fueron depositados en ZVCB.

Análisis químicos

El análisis para determinar el porcentaje de MO en los suelos extraídos de los sitios F y NF, se realizó en el Laboratorio Analítico Agroindustrial S.A (Paysandú;

Uruguay), utilizando el método Walkley-Black Method. Por otra parte, las sub-muestras de sedimentos de cada tratamiento de mesocosmos, se analizaron en el Departamento de Desarrollo Tecnológico (CURE, UdelaR, Uruguay). En todas las muestras se buscaron los siguientes AQ: Isoxaflutole; S-Metolaclor; Haloxifop R-metil; Sulfentrazone; Fipronil; Glifosato y ácido aminometil fosfórico (AMPA) (principal producto de degradación del Glifosato). La presencia y concentración de Glifosato y AMPA en las muestras de agua y sedimentos, se determinó mediante el método de cromatografía líquida de alta eficacia con detección por fluorescencia (HPLC-FLD). El resto de los AQ fueron analizados utilizando el método de cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Análisis de Datos

Variables fisicoquímicas del agua

Se aplicó un análisis de componentes principales (PCA), utilizando las variables fisicoquímicas del agua para evaluar el aporte de estas a la variación entre los tratamientos. Para analizar la variación de estos parámetros entre los distintos tratamientos de mesocosmos se aplicaron Análisis de varianza paramétrico (ANOVA) y en caso de no cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, el análisis de varianza no – paramétrico de Kruskal Wallis (Zar, 2010). En caso de detectarse diferencias significativas entre muestras, se utilizó la prueba de Tukey (análisis paramétrico) o el test de Mann-Whitney (análisis no – paramétrico) corregido por el criterio de Bonferroni (Zar, 2010), respectivamente. La normalidad de los datos, y la homogeneidad de varianzas, se probó utilizando el test de Shapiro-Wilk (SW), y el test de Levene (Zar, 2010), respectivamente.

Mortalidad, desarrollo y crecimiento

Para evaluar si existen diferencias en la mortalidad de las larvas entre los tratamientos de sedimentos, se utilizó un Análisis de varianza (ANVA) de dos factores; sedimentos de los distintos charcos y el tiempo de muestreo; y en caso de encontrarse diferencias significativas, se aplicó el test “post hoc” de Tukey (Zar, 2010). Las tasas de crecimiento (GR) y de desarrollo (DR) de las larvas, se calcularon de la siguiente manera: $GR = \exp (\ln (\text{masa final}/\text{masa inicial}) / \text{número de días del experimento})$; $DR = \text{etapa final-etapa inicial}/\text{número de días del experimento}$ (Teplitsky *et al.*, 2003). Las diferencias en GR y DR de las larvas entre los tratamientos, se evaluó utilizando el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y en caso de encontrar diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó el test de Mann-Whitney corregido por el criterio de Bonferroni (Zar, 2010). Además, para conocer si existen diferencias en la relación entre el log BL (mm) y el log M (g), un indicador de crecimiento de las larvas, se realizó una regresión funcional, comparando las pendientes mediante el

procedimiento propuesto por Warton *et al.* (2006). El tratamiento T3 Ch6, no se tuvo en cuenta para estos análisis, porque solo se dispuso de datos de dos larvas al final del experimento.

Anormalidades morfológicas y variables de las células sanguíneas

La prevalencia de un tipo particular de anomalía se calculó dividiendo el número de larvas que la presenta sobre el número de individuos examinados (Peltzer *et al.*, 2013). Por otra parte, las diferencias en la proporción total de anomalías morfológicas entre cada tratamiento de mesocosmos con sedimentos del sitio forestal y el control se analizaron mediante el test de proporción binomial (Margolin *et al.*, 1983). Las frecuencias de MN y de ANE se expresaron como la media $\pm$ el error estándar. Los datos de MN y ANE se analizaron utilizando el test de proporción binomial (Margolin *et al.*, 1983).

Metamorfos

Para determinar si existen diferencias en el número de metamorfos entre los tratamientos de mesocosmos, se realizó un análisis de varianza de dos vías, y en caso de encontrarse diferencias significativas, se aplicó la prueba *pos hoc* de Tukey (Zar, 2010), o el test pareado de Wilcoxon. Posteriormente, se determinó el Índice de Condición Corporal (BCI) de los metamorfos, un indicador del estado energético de los individuos. Para determinar este índice se utilizaron los residuos de la regresión $\text{Log}(M)=f[\text{Log}(LHC)]$; por considerarse uno de los métodos más apropiados para anfibios (Băncilă *et al.*, 2010). Las diferencias en la condición corporal entre los tratamientos se evaluaron utilizando el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y en caso de detectarse diferencias significativas, se utilizó el test de Mann-Whitney, corregido por el criterio de Bonferroni (Zar, 2010).

El nivel de significancia se estableció a $\alpha=0.05$. Los análisis estadísticos fueron realizados con el Software PAST (Paleontological STatistics) versión 2.17c (Hammer *et al.*, 2001); InfoStat versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020); y BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

RESULTADOS

Durante los muestreos de sedimentos en los cuerpos de agua del sitio forestal se detectó la presencia de distintas especies de anfibios. Se identificaron puestas y larvas de *Boana pulchella*; larvas de *Leptodactylus luctator* y *Pseudis minuta*; y también vocalizaciones de machos de *Pseudopaludicola falcipes* y *P. minuta*.

Párametros del agua y sedimentos

El porcentaje de MO para el control fue de 5.1%; para Ch2F fue de 2.9%, y para Ch6F fue de 3.5%. Se confirmó la presencia de algunos de los AQ utilizados durante el manejo de la forestación en los sedimentos provenientes de los cuerpos de agua del sitio forestal (Tabla 1). Los herbicidas Isoxaflutole y Aloxifop R-metil; y el insecticida Fipronil, no fueron detectados en ninguna de las muestras analizadas. El tratamiento T1ch6, mostró la presencia de un mayor número de AQ como el S-metolacoloro; el Sulfentrazone, el Glifosato, y su metabolito AMPA, que fue detectado, pero no cuantificable (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las variables fisicoquímicas del agua y de los residuos de agroquímicos en cada tratamiento de mesocosmos.

MESOCOSMOS	Control	TRATAMIENTOS SITIOS FORESTALES					
		T1Ch2	T1Ch6	T2Ch2	T2Ch6	T3Ch2	T3Ch6
Variables fisicoquímicas del agua							
Temperatura del agua (°C)	19.4 ± 2.4	19.4 ± 2.4	19.7 ± 2.5	19.5 ± 2.3	19.5 ± 2.2	19.4 ± 2.2	19.8 ± 2.8
pH	6.8 ± 0.6	7.6 ± 0.3	7.3 ± 0.4	7.3 ± 0.6	7.6 ± 0.3	7.6 ± 0.4	7.5 ± 0.4
Conductividad (µS/cm)	186 ± 31	267 ± 39	267 ± 29	271 ± 43	271 ± 38	240 ± 59	257 ± 35
Oxígeno disuelto (mg/L)	3.90 ± 1.30	3.47 ± 0.97	3.06 ± 0.87	3.49 ± 1.04	2.96 ± 0.98	3.99 ± 1.28	2.06 ± 1.19
Turbidez (FAU)	11.4 ± 5.0	16.5 ± 10.4	22.7 ± 11.4	30.1 ± 19.1	27.9 ± 15.7	25.4 ± 14.5	90.9 ± 69.8
Nitrato (ppm)	2 ± 2.45	2.67 ± 2.16	10.7 ± 9.46	2.67 ± 2.07	8.5 ± 6.16	2.33 ± 2.33	1.17 ± 1.60
Amonio (ppm)	0.54 ± 1.37	0.75 ± 0.37	2.5 ± 0.69	0.67 ± 0.49	2.46 ± 0.58	0.68 ± 0.41	1.13 ± 1.57
Fosfato (ppm)	0	0.17 ± 0.41	0.33 ± 0.52	0.17 ± 0.41	0.17 ± 0.41	0.17 ± 0.41	0.33 ± 0.52
Variables de los sedimentos							
Residuos de agroquímicos (µg/kg)							
S-metolacoloro	ND (1 µg/kg)	1.3	1.8	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)
Glifosato	ND (50 µg/kg)	ND (50 µg/kg)	103	ND (50 µg/kg)	114	ND (50 µg/kg)	ND (50 µg/kg)
AMPA	ND (50 µg/kg)	ND (50 µg/kg)	<QL (7 µg/kg)	ND (50 µg/kg)	<QL (5 µg/kg)	ND (50 µg/kg)	<QL (8 µg/kg)
Sulfentrazone	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	1	<QL (0.5 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	<QL (0.5 µg/kg)	ND (1 µg/kg)
Isoxaflutole	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)
Haloxifop R-metil	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)
Fipronil	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)	ND (1 µg/kg)

ND: No detectado; el superíndice indica el límite de cuantificación.

QL: Límite de cuantificación; en el superíndice se indica el valor estimado.

En relación con las variables fisicoquímicas del agua registradas en los mesocosmos a lo largo del experimento (Tabla 1), se encontró que el pH, la conductividad (µS/cm), el OD (mg/L) y la concentración de fosfato (ppm), estaban dentro del rango normal para la sustentabilidad de la vida acuática de vertebrados (USEPA, 1997; 2005; Burton & Pitt, 2001; Mann & Bidwell, 2001). Se encontraron diferencias significativas en la concentración de OD entre los tratamientos ($F_{(9,15-140)} = 7.55$; $p = 5.042 \times 10^{-7} < 0.05$), siendo significativamente más baja en T3Ch6, en relación

con el control ($p=5.089\text{e-}06 < 0.05$), T1Ch2 ($p=0.001 < 0.05$), T2Ch2 ($p=0.001 < 0.05$), y T3Ch2 ($p=1.568\text{e-}06 < 0.05$). Para la conductividad del agua también se encontraron diferencias significativas ($H=46.58$; $p=2.265\text{e-}08 < 0.05$); siendo más baja en el control en relación con el resto de los tratamientos de mesocosmos (C/T1Ch2: $p=1.06\text{e-}06 < 0.05$; C/T1Ch6: $p=1.664\text{e-}07 < 0.05$; C/T2Ch2: $p=9.316\text{e-}07 < 0.05$; C/T2Ch6: $p=3.062\text{e-}07 < 0.05$; C/T3Ch2: $p=0.047 < 0.05$; C/T3Ch6: $p=8.737\text{e-}07 < 0.05$) (Figura 3a). La temperatura del agua se mantuvo constante entre los distintos tratamientos de sedimentos ($H=0.86$; $p=0.99 > 0.05$). La turbidez del agua (FAU), presentó diferencias significativas entre tratamientos ($H=50.25$; $p=4.181\text{e-}09 < 0.05$); y estuvo por encima de los rangos normales para la sustentabilidad de la vida acuática (USEPA, 2000; NYCRR, 2017) en cada mesocosmos. Se destacó T3Ch6 por presentar una mayor turbidez en relación con el resto de los tratamientos (T3Ch6/T1Ch2: $p=2.528\text{e-}05 < 0.05$; T3Ch6/T1Ch6: $p=6.341\text{e-}05 < 0.05$; T3Ch6/T2Ch2: $p=0.0003 < 0.05$; T3Ch6/T2Ch6: $p=0.0002 < 0.05$; T3Ch6/T3Ch2: $p=7.833\text{e-}05 < 0.05$; T3Ch6/control: $p=9.829\text{e-}06 < 0.05$) (Figura 3b). En los tratamientos T1Ch6 y T2Ch6, la concentración de nitrato superó el valor máximo de 3 mg L^{-1} (Tabla 1), sugerido por USEPA (1997), para prevenir la eutrofización de los ecosistemas acuáticos, siendo en ambos casos significativamente mayor en relación con el control ($p=0.043 < 0.05$; en ambos casos) (Figura 3c). La concentración de amonio; también superó el valor máximo de 0.6 mg L^{-1} sugerido para anfibios (Jofre & Karasov, 1999), en todos los tratamientos de sedimentos forestales, con excepción del control (Tabla 1), siendo más elevada en los tratamientos con sedimentos provenientes del charco 6 (Figura 3d). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de fosfato entre los distintos tratamientos de sedimentos ($H=0.65$; $p=0.94 > 0.05$). Los factores 1 y 2 del análisis de componentes principales (ACP), explicaron el 99.6% de la variación total entre los tratamientos. Para el factor 1, la variable que más aportó fue la conductividad del agua (0.98), y para el factor 2 fue la turbidez del agua (0.98) (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del análisis de componentes principales y contribución de las variables analizadas a los componentes principales.

Variables fisicoquímicas del agua	Componentes principales		
	PC 1	PC 2	PC 3
Temp. agua (°C)	-0.0049	-0.0072	-0.0422
pH	0.00003	0.0025	0.0091
Conductividad (us/cm)	0.9836	-0.1803	-0.0044
OD (mg/l)	-0.0027	-0.0077	-0.0853
Nitrato (ppm)	0.0022	-0.011	0.9878
Amonio (ppm)	0.0007	0.00004	0.1221
Fosfato (ppm)	-0.00004	-0.0006	-0.0058
Turbidez (FAU)	0.1803	0.9835	0.0093

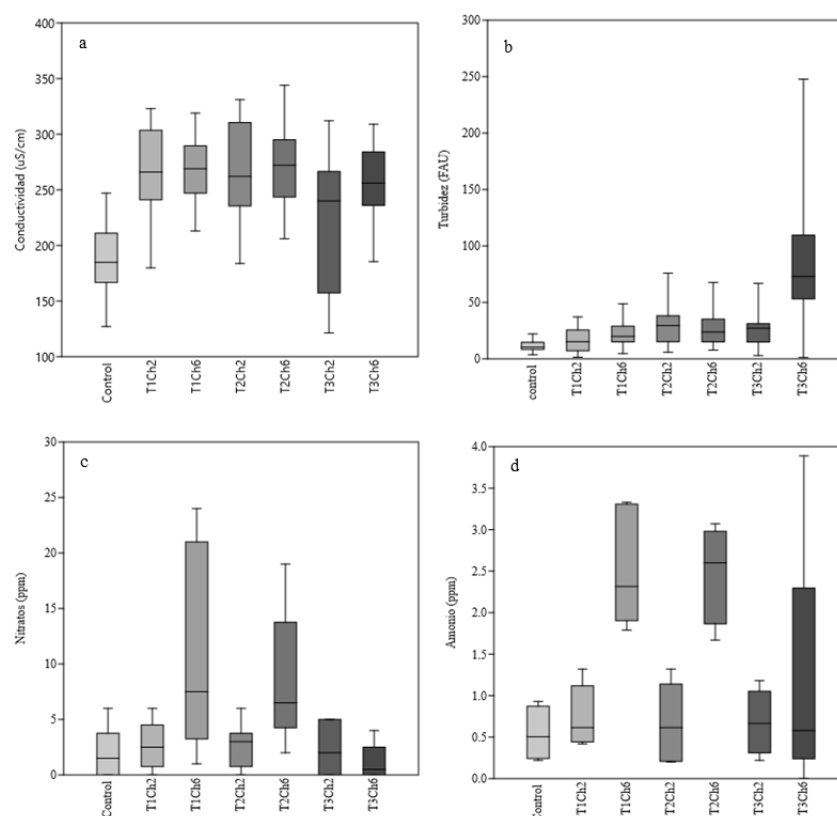


Figura 3. Variación en la conductividad (a), turbidez (b), y concentración de nitrato (c) y amonio (d) del agua, en los tratamientos de mesocosmos durante el experimento.

Respuestas biológicas

Mortalidad, desarrollo y crecimiento.

Se observaron diferencias significativas en la mortalidad de las larvas entre los sedimentos de los charcos ($F_{(1,14)} = 22.10$; $p = 0.0003 < 0.05$); y entre los tiempos ($F_{(3,14)} = 6.24$; $p = 0.007 < 0.05$). Para todos los tiempos de muestreo (T1, T2 y T3), la mortalidad fue significativamente mayor en relación con el grupo control (T1/C: $p = 0.007 < 0.05$; T2/C: $p = 0.007 < 0.05$; T3/C: $p = 0.03 < 0.05$). Además, en los mesocosmos con sedimentos provenientes de Ch2F; la mortalidad fue mayor en relación con los tratamientos Ch6F ($p = 0.006 < 0.05$), y el control ($p = 0.04 < 0.05$) (Figura 4). Se encontraron diferencias significativas en las tasas de desarrollo de las larvas entre tratamientos ($H = 11.02$; $p = 0.04 < 0.05$). Si bien las diferencias significativas se observaron entre T1Ch6 con el control ($p = 0.01 < 0.05$) y con T1Ch2 ($p = 0.01 < 0.05$), la media para T1Ch6 alcanza valores más altos en relación con el resto de los tratamientos (Figura 5). No se observaron diferencias significativas en las tasas de crecimiento de las larvas entre los tratamientos de sedimentos ($H = 4.52$, $p = 0.48 > 0.05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar las regresiones Log BL (mm)/Log M

(g) de las larvas para cada tratamiento (pendiente común, máxima verosimilitud=2.43; $\text{Chi}^2=1.96$; $p=0.85 > 0.05$).

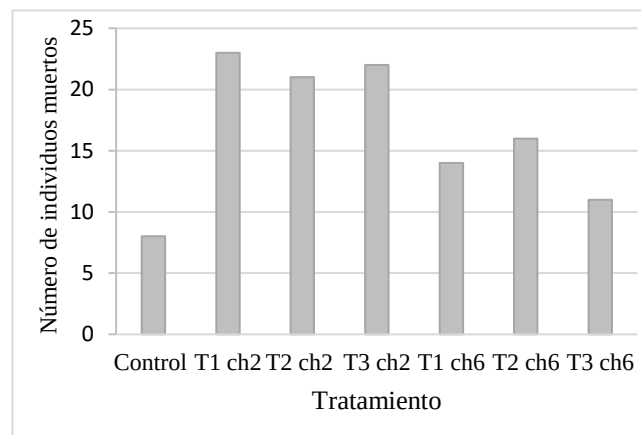


Figura 4. Variación en el número de individuos muertos de *Physalaemus gracilis* en los distintos tratamientos de mesocosmos durante el experimento.

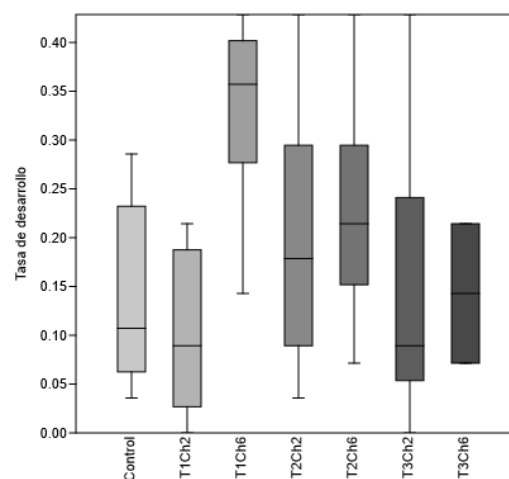


Figura 5. Variación en la tasa de desarrollo de individuos de *Physalaemus gracilis* en los distintos tratamientos de mesocosmos durante el experimento.

Anormalidades morfológicas

Se observaron nueve tipos de anomalías morfológicas en las larvas de *Physalaemus gracilis* expuestas a los tratamientos de sedimentos: Cuerpo cóncavo ventralmente (CB); cuerpo hinchado (SB); flexión de la cola (TF); cola curva o rígida (ST); intestino desviado (DG); enrollamiento anormal del intestino (U); pérdida de queratodontes (KL); alteraciones en el pico córneo (AJS); y ojo reducido (M) (Figura 6). La comparación estadística entre los tratamientos mostró que la proporción total de anomalías fue significativamente mayor en los individuos de los tratamientos con

sedimentos provenientes del sitio forestal en relación con el control (C) (Tabla 3). A lo largo de la exposición, la mayor frecuencia de anomalías se observó en larvas del tratamiento T1Ch6, donde el 75 % de los individuos analizados presentaron malformaciones; y en T1Ch2, donde el 63.3% de los individuos analizados presentaron malformaciones (Tabla 3). La ausencia de queratodontes y el enrollamiento anormal del intestino fueron de las anomalías más prevalentes en las larvas expuestas a los sedimentos forestales (Tabla 3). Cabe destacar, que registramos individuos expuestos a estos tratamientos, con más de una anomalía morfológica.

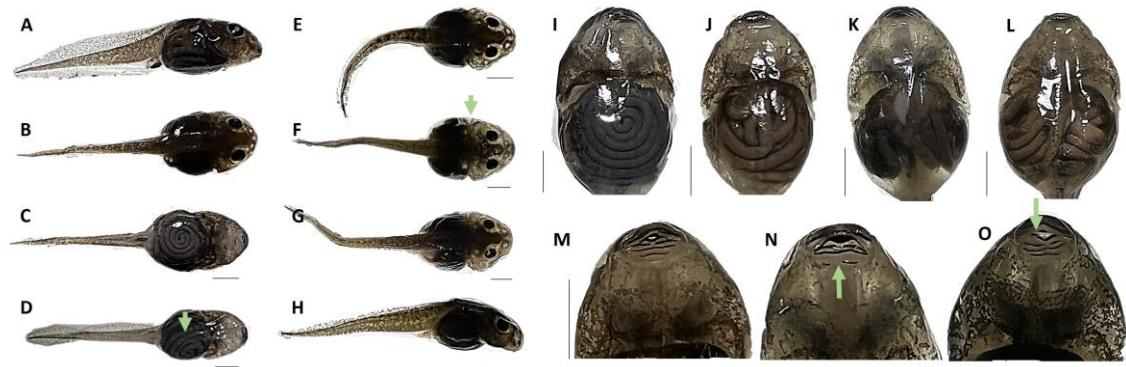


Figura 6. Anormalidades morfológicas detectadas en larvas de *Physalaemus gracilis* expuestas a los tratamientos de sedimentos forestales. Referencias: A, B, y C: Larva normal del control sin anomalías morfológicas (GS 32): vista lateral, dorsal y ventral; D: Intestino desviado (DG) (GS 33); E: Cola rígida (ST) (GS30); F: Cuerpo hinchado (SB) (GS30); G: Flexión de la cola (TF) (GS 35); H: Cuerpo cóncavo (CB) (GS29); I: Intestino normal (GS 36); J, K y L: Enrollamiento anormal del intestino (U) (GS 30, 36, y 32, respectivamente); M: Disco oral sin alteraciones (GS 29); N: Pérdida de queratodontes (GS 36); O: anomalía en el pico córneo (GS 34). La barra negra representa una Escala de 5 mm. El estadio de desarrollo de las larvas según Gosner (1960), se indica entre paréntesis.

Tabla 3. Prevalencia de anormalidades en larvas de *Physalaemus gracilis* expuestas a los diferentes tratamientos de sedimentos. Referencias: CB: cuerpo cóncavo ventralmente; SB: cuerpo hinchado; TF: flexión de la cola; ST: cola curva o rígida; DG: intestino desviado; U: enrollamiento anormal del intestino; KL: pérdida de queratodontes; AJS: alteraciones en el pico córneo; y RE: ojo reducido. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: diferencias significativas con respecto al control negativo (Test de proporción binomial).

Tratamientos	Anormalidades morfológicas									Total
	CB	SB	TF	ST	DG	U	KL	AJS	RE	
Control	0	0	0.04	0	0	0	0.04	0	0	0.07
T1Ch2	0.03	0.03	0.13	0	0.13	0.20	0.33	0.03	0	0.90***
T1Ch6	0.07	0.11	0.11	0.11	0.14	0.18	0.18	0	0.07	0.96***
T2Ch2	0.03	0.07	0	0.03	0.03	0.03	0.34	0.03	0	0.59***
T2Ch6	0	0.15	0	0.04	0.07	0.15	0.26	0.04	0	0.70***
T3Ch2	0	0	0.03	0.03	0.07	0.07	0.21	0	0.03	0.45**
T3Ch6	0	0	0.04	0	0.09	0.13	0.04	0.09	0	0.39**

Parámetros de las células sanguíneas (MN y ANE)

Se identificó la presencia de micronúcleos (MN) (Figura 7E), y de distintos tipos de aberraciones nucleares (Figura 7B, C, D, F-L) en los eritrocitos de larvas de *Physalaemus gracilis*. Las frecuencias de MN en larvas expuestas a los sedimentos provenientes del sitio forestal fueron significativamente mayores que en el grupo de control negativo (C/T1Ch2: $Z=-1.78$; $p=0.04 < 0.05$; C/T1Ch6: $Z=-2.75$; $p=0.003 < 0.05$; C/T2Ch2: $Z=-2.31$; $p=0.01 < 0.05$; C/T2Ch6: $Z=-2.4$; $p=0.01 < 0.05$; C/T3Ch2: $Z=-1.95$; $p=0.03 < 0.05$; y C/T3Ch6: $Z=-1.89$; $p=0.03 < 0.05$) (Figura 8A). Las frecuencias de ENA también fueron significativamente mayores que en el grupo de control negativo (C/T1Ch2: $Z=-3.83$; $p<0.0001$; C/T1Ch6: $Z=-6.55$; $p<0.0001$; C/T2Ch2: $Z=-2.17$; $p=0.02 < 0.05$; C/T2Ch6: $Z=-7.23$; $p<0.0001$; C/T3Ch2: $Z=-1.73$; $p=0.04 < 0.05$) (Figura 8B), con la excepción del tratamiento T3Ch6; donde no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de ENA con el control ($Z=0.05$; $p=0.48 > 0.05$). Notamos que en las larvas expuestas al tratamiento T1Ch6, que presentó la mayor cantidad de agroquímicos, la frecuencia de MN fue mayor que en el resto de los tratamientos (Figura 8A). La mayor frecuencia de ANE también se observó en T1Ch6 y en T2Ch6 (Figura 8B). En las larvas expuestas a los sedimentos del sitio forestal, predominaron las aberraciones del tipo núcleo con muesca (NN); células binucleadas (BE); núcleo en forma de riñón (K); núcleo con brote (BN); eritoplástido o eritrocito anucleado (EP); y núcleo lobado (LN) (Tabla 4). Los EP, solo se observaron en las larvas expuestas a los sedimentos provenientes del sitio forestal (Tabla 4).

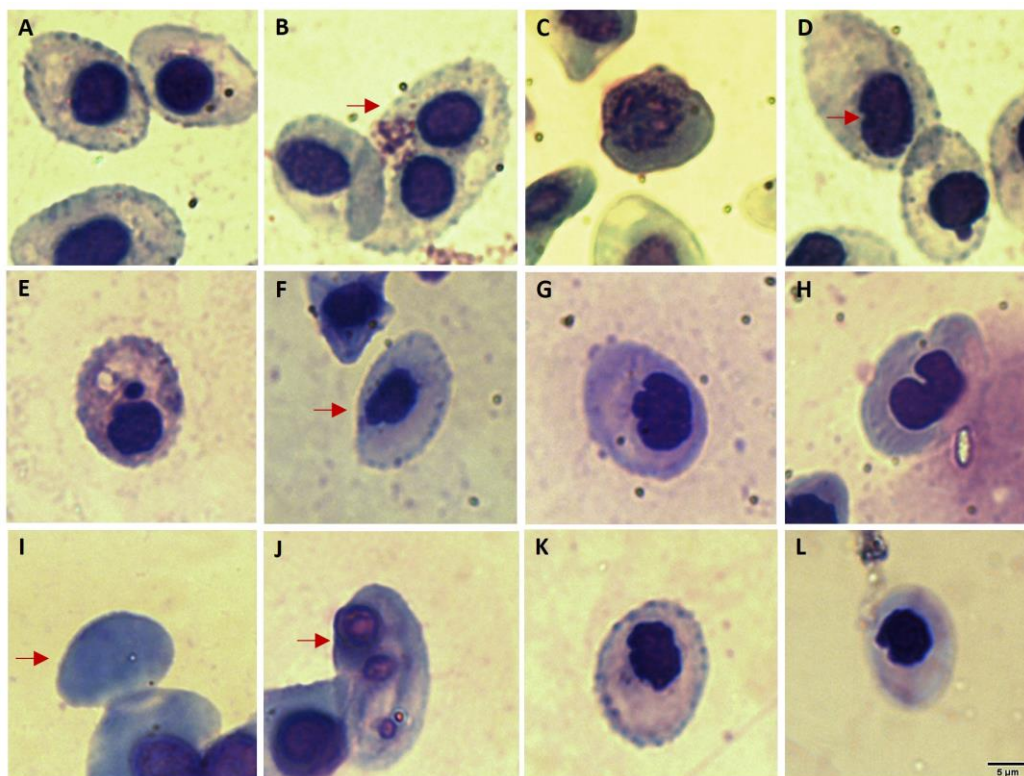


Figura 7. Detalle de eritrocitos observados en larvas de *Physalaemus gracilis* expuestas a sedimentos provenientes del sitio forestal. (A) eritrocitos normales; (B) eritrocito binucleado (BE); (C) célula apoptótica (AP); (D) núcleo en forma de riñón (K) (flecha roja), y núcleo con brote (BN); (E) Micronúcleo (MN); (F) núcleo lobado (LN); (G) núcleo lobulado (LbN); (H) núcleo en forma de herradura (HN); (I) eritoplástido o eritrocito anucleado (EP) (flecha roja); (J) eritrocito multinucleado (tres núcleos) (ME); (K) núcleo ampollado (BbN); (L) núcleo con muesca (NN). May Grünwald-Giemsa, 100x. La barra negra representa una escala de 5 μ m.

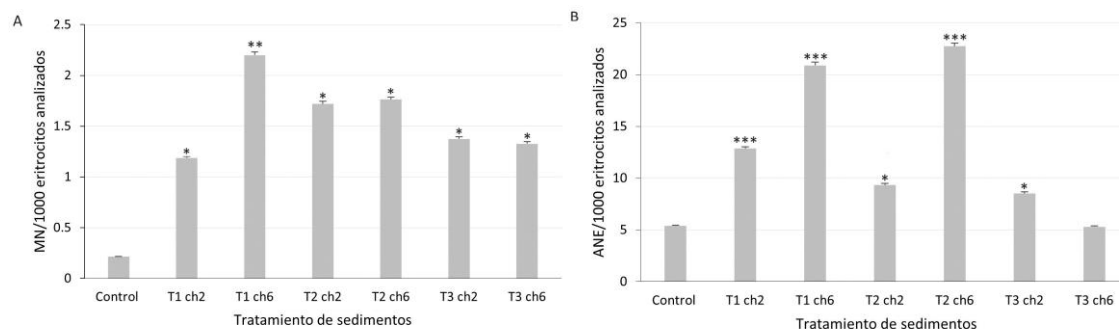


Figura 8. Frecuencia de micronúcleos (MN) (A) y de Aberraciones nucleares en los eritrocitos (ANE) (B) por 1000 células, en larvas de *Physalaemus gracilis* expuestas a diferentes tratamientos de sedimentos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: diferencias significativas con respecto al control negativo (Test de proporción binomial).

Tabla 4. Frecuencia (%) de distintos tipos de aberraciones nucleares en eritrocitos (ANE) de larvas de *P. gracilis* expuestas a diferentes tratamientos de sedimentos (media $\pm$ SE). BE: Eritrocito binucleado; K: núcleo en forma de riñón; EP: eritoplástido o eritrocito anucleado; BN: núcleo con brote; LN: núcleo lobado; BbN: núcleo ampollado; NN: núcleo con muesca; AP: célula apoptótica; LbN: núcleo lobulado; HN: núcleo en forma de herradura; ME: eritrocito multinucleado.

ANE	Tratamiento de sedimentos						
	Control	T1Ch2	T1Ch6	T2Ch2	T2Ch6	T3Ch2	T3Ch6
BE	0.65 $\pm$ 0.01	1.98 $\pm$ 0.03	2.42 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.02	3 $\pm$ 0.04	1.65 $\pm$ 0.03	1.33 $\pm$ 0.02
K	1.94 $\pm$ 0.03	2.57 $\pm$ 0.04	3.08 $\pm$ 0.05	1.47 $\pm$ 0.02	2.29 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.01	0
EP	0	0.79 $\pm$ 0.01	1.98 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.01	1.06 $\pm$ 0.01	1.92 $\pm$ 0.03	0.80 $\pm$ 0.01
BN	0	0	2.42 $\pm$ 0.04	1.23 $\pm$ 0.02	2.65 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.01
LN	0.22 $\pm$ 0.003	0.79 $\pm$ 0.01	2.20 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.01	2.65 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.004
BbN	0.22 $\pm$ 0.003	0.79 $\pm$ 0.01	1.10 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.01	1.94 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.004
NN	1.51 $\pm$ 0.02	4.95 $\pm$ 0.07	5.72 $\pm$ 0.08	3.68 $\pm$ 0.06	6.35 $\pm$ 0.08	1.65 $\pm$ 0.03	1.59 $\pm$ 0.03
AP	0	0.79 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.01	0	0.35 $\pm$ 0.01	0.82 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.01
LbN	0.43 $\pm$ 0.01	0	0.22 $\pm$ 0.003	0	0.71 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.01	0
HN	0.43 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.003	0.66 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.01	1.41 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.01	0
ME	0	0	0.44 $\pm$ 0.01	0	0.35 $\pm$ 0.01	0	0

Metamorfos

A lo largo del experimento culminaron su metamorfosis 252 individuos de *P. gracilis*. Se encontraron diferencias significativas en el número de metamorfos entre los

charcos ($F_{(1,14)} = 29.76$; $p = 8.47 \times 10^{-5} < 0.05$), y entre los tiempos ($F_{(3,14)} = 4.09$; $p = 0.03 < 0.05$); en los distintos tratamientos de mesocosmos. El número de metamorfos en los mesocosmos con sedimentos provenientes del charco 6 de la forestal, fue significativamente mayor (Figura 9), en comparación con el resto de los tratamientos (para el control: $p = 0.04 < 0.05$; para Ch2: $p = 0.004 < 0.05$). También se observaron diferencias significativas entre el control y T3 ($p = 0.02 < 0.05$); posiblemente a causa de la gran variación que existe en el número de metamorfos para el tiempo 3; ya que se incluyen datos de los dos charcos (Ch2 y Ch6); mientras que el control solo incluye datos de un charco. En relación con el tiempo de metamorfosis; en la mayoría de los tratamientos de sedimentos, las larvas culminaron su metamorfosis entre los 20 y 40 días de exposición (Figura 10). En el tratamiento T1Ch6, el 31% de las larvas culminó su metamorfosis entre los primeros 10 y 20 días de exposición. En el resto de los tratamientos con sedimentos del sitio forestal se observan metamorfos para estos rangos de días, aunque en una menor proporción (Figura 10). Finalmente, se encontraron diferencias significativas en el BCI de los metamorfos entre los distintos tratamientos de sedimentos ($H = 29.59$; $p = 4.68 \times 10^{-5} < 0.05$). La prueba de comparación de a pares mostró que el BCI fue significativamente mayor en los metamorfos provenientes del control en relación con los metamorfos provenientes del resto de los tratamientos de mesocosmos (C/T1Ch2: $p = 8.81 \times 10^{-5} < 0.05$; C/T1Ch6: $p = 1.32 \times 10^{-5} < 0.05$; C/T2Ch2: $p = 2.994 \times 10^{-6} < 0.05$; C/T2Ch6: $p = 4.94 \times 10^{-5} < 0.05$; C/T3Ch2: $p = 7.06 \times 10^{-5} < 0.05$; C/T3Ch6: $p = 1.508 \times 10^{-6} < 0.05$; $p < 0.05$) (Figura 11).

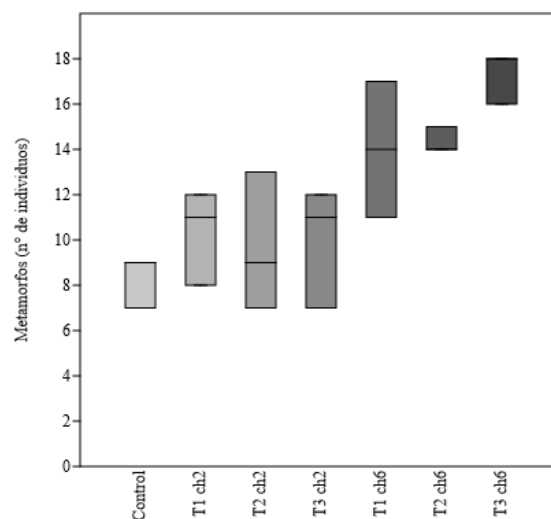


Figura 9. Variación en el número de metamorfos de *Physalaemus gracilis* entre los distintos tratamientos de mesocosmos durante el experimento.

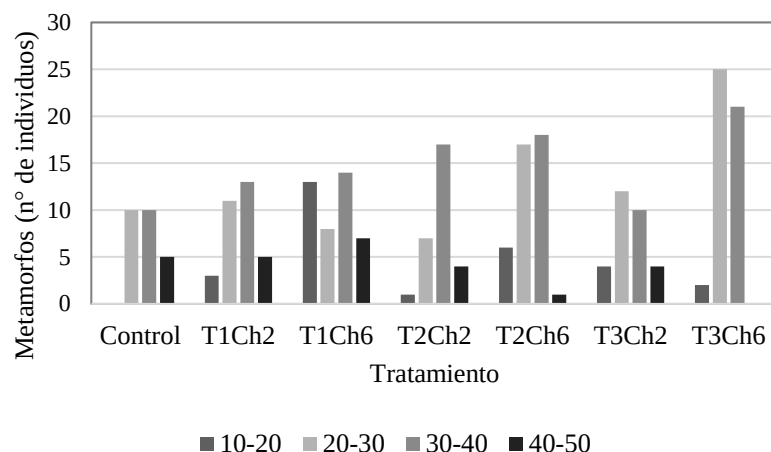


Figura 10. Variación en el número de metamorfos de *Physalaemus gracilis* por tratamiento en función del tiempo de metamorfosis en rangos. Referencias: 10-20; 20-30; 30-40; 40-50: Rangos de metamorfosis en días desde el comienzo del experimento (día 1).

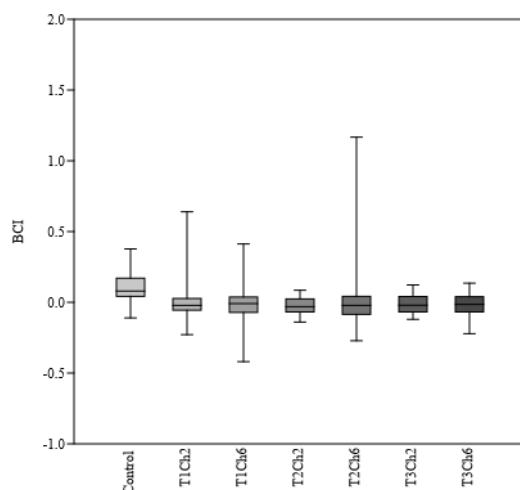


Figura 11. Variación en el Índice de condición corporal de los metamorfos de *Physalaemus gracilis* entre los distintos tratamientos de mesocosmos durante el experimento.

DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos se comprobó que algunos de los AQ utilizados en la forestación de estudio como el S-metolacoloro; el Sulfentrazone, el Glifosato, y su metabolito AMPA, llegan a los cuerpos de agua superficiales presentes en estos sitios, asociándose y contaminando a los sedimentos. El porcentaje de materia orgánica registrado en los suelos forestales propiciaría la retención de AQ, que en general aumenta en función de este porcentaje (López *et al.*, 1992; Ohmes, 1999; González & Fuentes, 2022). Además, se registraron niveles muy altos de amonio y nitrato en los tratamientos con sedimentos provenientes del sitio forestal en

comparación con el tratamiento con sedimentos del sitio control. Todo esto, representa un riesgo para los organismos acuáticos que identificamos en el sitio de estudio como las larvas de anuros y peces. El abordaje experimental resultó útil para estudiar los efectos de los sedimentos contaminados en un contexto ecológicamente relevante. Además, por sus hábitos bentónicos (Santos, 2022), las larvas de *Physalaemus gracilis* estuvieron en contacto estrecho con los sedimentos durante el experimento; y fueron sensibles a la exposición, confirmando que la especie es un buen modelo indicador para estudios ecotoxicológicos, como fue reportado previamente (ej. Macagnan *et al.*, 2017; Vanzetto *et al.*, 2019; Herek *et al.*, 2020, 2021; Rutkoski *et al.*, 2020; 2021).

Mortalidad, desarrollo y crecimiento

Se observó un efecto del tratamiento de sedimentos en la mortalidad de larvas de *P. gracilis*. Esta fue mayor en los tratamientos con sedimentos provenientes de Ch2F, en relación con el control y con los mesocosmos con sedimentos de Ch6F. La diferencia entre los tratamientos con sedimentos del sitio forestal, no se podría atribuir a la calidad del agua, ni a la presencia, mayor concentración, o mezcla de agroquímicos, ya que en el tratamiento T1Ch6 se detectó la mayor cantidad de AQ; así como la mayor concentración de S-metolacoloro. Además, en los tratamientos T1Ch6 y T2Ch6, se reportaron los valores medios más altos de nitrato (siendo significativamente mayores que los tratamientos con sedimentos de Ch2F), y este puede ejercer una acción tóxica sobre las larvas de anfibios, incluso a concentraciones bajas (Camargo *et al.*, 2005). No obstante, en los tres tratamientos con sedimentos provenientes de Ch6F, el número de metamorfos fue significativamente mayor que en el resto de los tratamientos de mesocosmos, y además se observó una metamorfosis más temprana (particularmente en T1Ch6), lo cual podría explicar las diferencias observadas en la mortalidad de las larvas. Estos resultados contrastan con los reportados previamente en sistemas similares, donde no se detectaron diferencias significativas en la mortalidad de las larvas (Snodgrass *et al.*, 2008; Peltzer *et al.*, 2013; Sansiñena *et al.*, 2018).

Contrario a lo esperado, los tratamientos de sedimentos no tuvieron un efecto subletal significativo en las tasas de crecimiento de las larvas de *P. gracilis*. Sin embargo, se observó un efecto a nivel del desarrollo. Las larvas del tratamiento T1Ch6 mostraron una mayor tasa de desarrollo que las del control; y las de T1Ch2. En el resto de los tratamientos no se observaron diferencias significativas en este parámetro. Por lo tanto, se considera que el efecto observado, puede atribuirse al perfil químico de ese tratamiento en particular, donde se detectó un mayor número de pesticidas; y también el metabolito del glifosato AMPA. La metamorfosis de los anfibios se encuentra regulada por la hormona tiroidea (TH) (Brown & Cai, 2007). Algunos contaminantes químicos, pueden interferir con la función tiroidea, acelerando o reduciendo el tiempo de metamorfosis (Fort *et al.*, 2000; Helbing *et al.*, 2006). Además, la actividad de esta

hormona también puede ser inducida por estrés (ej. desecación de un cuerpo de agua) (Denver, 1997), por lo cual, en respuesta a las condiciones de exposición experimentales, las larvas podrían acelerar su desarrollo. En este sentido, se ha reportado ampliamente que las larvas de anfibios pueden incrementar sus tasas de desarrollo, como una respuesta adaptativa a condiciones de estrés, por la exposición a xenobióticos. Por ejemplo, una aceleración en el desarrollo se observó en larvas de *Rana cascadae* y de *Leptodactylus luctator* (GS 25) expuestas al glifosato (Cauble & Wagner; 2005; Bach *et al.*, 2016, respectivamente); en larvas de *Physalaemus albonotatus* expuestas a un herbicida comercial a base de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (Curi *et al.*, 2019); en larvas de *Trachycephalus typhonius* expuestas a sedimentos contaminados con alto contenido de metales (Peltzer *et al.*, 2013); en larvas de *Scinax squalirostris* expuestas al insecticida Lambda-cyhalothrin en un campo de arroz (Attademo *et al.*, 2014); en larvas de *Bufo bufo* en sitios agrícolas (Orton & Routledge, 2011); y en larvas de *Hyla versicolor* expuestas a sedimentos contaminados de estanques de aguas pluviales (Brand *et al.*, 2010). Por lo tanto, en función de los resultados encontrados, la mezcla de herbicidas detectada en el tratamiento T1Ch6, podría considerarse como un agente estresante para las larvas de *P. gracilis*, al acelerar su desarrollo.

Anormalidades morfológicas

Los tratamientos de mesocosmos con sedimentos provenientes del sitio forestal indujeron anomalías morfológicas en larvas de *Physalaemus gracilis* expuestas. La presencia de anomalías morfológicas se ha relacionado con la exposición a agroquímicos en larvas de anuros (ej. Sansiñena *et al.*, 2018; Curi *et al.*, 2019; Pérez-Iglesias *et al.*, 2020; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022). En este estudio, se detectó la mayor frecuencia de anomalías en larvas expuestas a los tratamientos T1Ch6, T1Ch2, y T2Ch6; sedimentos donde se detectaron las mayores concentraciones de herbicidas, e incluso mezclas (particularmente en T1Ch6 y T2Ch6). La capacidad de inducir anomalías morfológicas por alguno de los pesticidas detectados en los sedimentos analizados, como el glifosato (Lajmanovich *et al.*, 2003; Bach *et al.*, 2016); y el S-metolaclo-ro (Quintaneiro *et al.*, 2018; ver capítulo 4), ha sido reportada para larvas de anuros. Por lo tanto, la aparición de malformaciones podría ser una herramienta útil de evaluación o un buen indicador de contaminación de cuerpos de agua-sedimentos en sitios agrícolas (Bach *et al.*, 2016).

Las anomalías más prevalentes en las larvas de *P. gracilis*, fueron la ausencia de queratodontes y el enrollamiento anormal del intestino. Resultados similares se observaron para larvas de la especie expuestas a insecticidas formulados a base de chlorpyrifos (Rutkoski *et al.*, 2020); cipermetrina y deltametrina (Vanzetto *et al.*, 2019); y al herbicida Roundup original® DI, a base de glifosato (Herek *et al.*, 2020). Las

anomalías a nivel del disco oral e intestino son frecuentes en larvas de anuros expuestas a agroquímicos (Pérez-Iglesias *et al.*, 2015; Sansiñena *et al.*, 2018; Curi *et al.*, 2019; ver capítulo 4). Se ha demostrado que la pérdida de queratodontes reduce la eficiencia de la alimentación y forrajeo de las larvas (Rowe *et al.*, 1996; Venesky *et al.*, 2010). Las anomalías a nivel del intestino también repercuten negativamente en la alimentación, afectando la absorción de nutrientes (Sansiñena, 2020; Pavan *et al.*, 2021). En consecuencia, este tipo de anomalías pueden comprometer la supervivencia de las larvas (Pérez-iglesias *et al.*, 2015; Rutkoski *et al.*, 2020). Por lo tanto, el claro predominio en el porcentaje de anomalías a nivel de los queratodontes y del intestino reportado en T1Ch2, en relación con el resto de los mesocosmos, podría explicar la alta mortalidad registrada en este tratamiento. Cabe destacar que otras malformaciones observadas en las larvas expuestas a los tratamientos de sedimentos, como el cuerpo hinchado, el cuerpo cóncavo; así como las anomalías a nivel de la cola, pueden afectar la movilidad (Bach *et al.*, 2016; Sansiñena *et al.*, 2018); lo cual también resulta perjudicial para la alimentación y aumenta el riesgo de depredación (Pérez-iglesias *et al.*, 2015). Se concluye que los sedimentos contaminados de sitios forestales representan un riesgo para las larvas de *P. gracilis*, al inducir anomalías morfológicas, que pueden reducir su aptitud; y afectar su supervivencia, entre otros efectos.

Parámetros de las células sanguíneas

Nuestros resultados revelaron que todos los tratamientos de sedimentos del sitio forestal fueron capaces de inducir un incremento en la frecuencia de MN y de ANE en los eritrocitos de larvas de *P. gracilis* expuestas, evidenciando el poder genotóxico y citotóxico de los herbicidas presentes en estos sedimentos. El tratamiento T1Ch6, mostró la mayor frecuencia de MN, por lo cual podríamos suponer que, en la mezcla, los herbicidas Glifosato y su metabolito AMPA, Sulfentrazone y S-metolacoloro, actúan sinérgicamente potenciando su genotoxicidad sobre larvas de *P. gracilis*. Apoyando la idea anterior, la mayor frecuencia de ANE se reportó en el tratamiento T2Ch6, dónde se detectó la presencia de Glifosato más AMPA. Los efectos genotóxicos del glifosato fueron reportados para larvas de *P. gracilis* (Herek *et al.*, 2021). Además, la existencia de una interacción toxicológica sinérgica entre agroquímicos que incluyen formulados comerciales a base de glifosato, sobre larvas de anuros, ya ha sido demostrada (Brodeur *et al.*, 2014; Soloneski *et al.*, 2016). Cabe mencionar que los excipientes presentes en los formulados comerciales de los AQ utilizados durante el manejo de la forestación, también pueden influir en el efecto genotóxico observado, ya que estos compuestos pueden incluso ser más tóxicos que el propio ingrediente activo (Nikoloff *et al.*, 2013; Lajmanovich *et al.*, 2014). En general los excipientes no son declarados, son desconocidos, por lo cual resulta muy difícil predecir la toxicidad de mezclas de formulados comerciales de AQ. En consecuencia, los efectos tóxicos y genotóxicos

observados en las larvas de *P. gracilis* expuestas a los sedimentos forestales podría atribuirse al sinergismo entre distintos compuestos químicos y nutrientes como el nitrato.

Las ANE mostraron una mayor frecuencia en todos los tratamientos de mesocosmos en relación con los MN, y si bien los complementan en las evaluaciones de genotoxicidad (Benvindo-Souza *et al.*, 2020), son biomarcadores más sensibles (Pollo *et al.*, 2020; Herek *et al.*, 2020). Un aumento en su presencia se ha informado en situaciones de estrés, y estaría revelando una reacción celular adversa y/o un mecanismo para eliminar células con daño genético (Ray *et al.*, 2005). Por ejemplo, un incremento en la presencia de BE estaría indicando división celular anormal, específicamente bloqueo de la citocinesis (Cavas *et al.*, 2005; Mahboob *et al.*, 2014), considerándose un evento genotóxico. Otras ENA como los núcleos con muescas o con forma de riñón, se asocian a citotoxicidad (Bolognesi *et al.*, 2006). Los EP se relacionan con la optimización en la captación de oxígeno en ambientes contaminados (Barni *et al.*, 2007; Lajmanovich *et al.*, 2014), y en nuestro estudio fue la única ANE detectada en todos los tratamientos de sedimentos del sitio F, pero no en el grupo control. El incremento en las frecuencias de MN y ANE como respuesta a agentes genotóxicos, puede derivar en un aumento en la teratogénesis, tumores, y una disminución en la aptitud de la especie afectada (Peluso *et al.*, 2020). En función de nuestros resultados, podemos inferir que los parámetros de las células sanguíneas evaluados en larvas de *P. gracilis* son buenos indicadores de la contaminación de los sedimentos en sitios forestales. Además, estos biomarcadores son señales de alerta temprana de exposición a agroquímicos (Attademo *et al.*, 2014; Lajmanovich *et al.*, 2021), y permiten detectar los efectos adversos de la exposición antes de que sean evidentes a niveles superiores de organización.

Metamorfos

Las larvas de anuros pueden incrementar sus tasas de desarrollo y alcanzar en menor tiempo la metamorfosis como una respuesta adaptativa a condiciones de estrés, como ambientes desfavorables (Newman *et al.*, 1989; Denver, 1997). En general, cuando esto ocurre los renacuajos se metamorfosean a expensas de un tamaño corporal más pequeño (Semlitsch & Caldwell, 1982; Newman *et al.*, 1989). Observamos un mayor número de metamorfos y una metamorfosis más rápida, en larvas expuestas a los sedimentos provenientes del charco 6 del sitio forestal. En los tratamientos T1Ch6 y T2Ch6 se reportó el mayor número de AQ, y se registraron los mayores niveles de nitrato y amonio en agua. La concentración de nitrato determinada en T1Ch6 es muy cercana a las reportadas para charcos agrícolas (Peltzer *et al.*, 2008). En T3Ch6, si bien solo se reportó la presencia del metabolito AMPA en el sedimento, se registró la mayor turbidez y el menor valor de oxígeno disuelto en agua, que se corresponde con el valor mínimo necesario para la sustentabilidad de los anfibios (Mann & Bidwell, 2001), en

comparación con el resto de los tratamientos de mesocosmos. También se registró una concentración más alta de amonio en este tratamiento, en relación con los tratamientos con sedimentos provenientes del charco 2 del sitio forestal. Las concentraciones anormalmente elevadas de compuestos nitrogenados como amonio, nitrito y nitrato en el agua, pueden provocar efectos tóxicos, sobre animales acuáticos, afectando la supervivencia, el crecimiento, y la reproducción (Camargo & Alonso, 2007). La toxicidad del nitrato se debe a la conversión de pigmentos que transportan oxígeno, en formas incapaces de cumplir esta función; y se ha demostrado que en animales acuáticos aumenta en función de la concentración y del tiempo de exposición (Camargo *et al.*, 2005). Las larvas de anfibios resultaron ser sensibles a concentraciones relativamente bajas de nitrato en agua (Camargo *et al.*, 2005). Se ha reportado una disminución en la alimentación, pérdida de masa y una alta mortalidad en larvas de *Bufo bufo* expuestas durante 13 días a 9.1 mg/L de nitrato (Baker & Waights, 1993), y también una reducción en el crecimiento y el tamaño de los metamorfos en larvas de *Rana temporaria* expuestas a 5.0 mg/L de nitrato (Johansson *et al.*, 2001). Estas concentraciones se encuentran por debajo de las reportadas en T1Ch6; y una de ellas (5.0 mg/L) por debajo de la registrada en T2Ch6. Por lo tanto, en su conjunto, las condiciones de los mesocosmos con sedimentos provenientes de Ch6F, propiciarían un ambiente desfavorable para las larvas de *P. gracilis*, que respondieron acelerando la metamorfosis, a expensas de una buena condición corporal. En el tratamiento control, metamorfosearon menos individuos, pero los que lo hicieron tuvieron una mejor condición corporal. Además, el control fue el tratamiento donde se observó la mayor cantidad de larvas vivas al cierre del experimento. Probablemente, estas larvas invierten más tiempo en crecer y prolongan su desarrollo, para poder metamorfosearse a mayores tamaños, y en consecuencia con una mejor condición corporal.

Un tamaño más pequeño en la metamorfosis se observó en larvas de *Rana pipiens* expuestas a una mezcla de pesticidas, que incluye al herbicida S-metolacoloro (Hayes *et al.*, 2006); uno de los herbicidas detectado en los sedimentos de estudio. Adicionalmente, una condición corporal deficiente en metamorfos como consecuencia de un desarrollo larval acelerado en respuesta a un ambiente inadecuado fue observada en sistemas experimentales similares (Babini *et al.*, 2016; Peltzer *et al.*, 2013). Probablemente, las larvas de *P. gracilis* expuestas a los sedimentos contaminados de Ch6F incrementan la utilización de sus reservas de energía para acelerar la metamorfosis, lo que resultaría en una disminución de la condición corporal. En general, las larvas de anfibios que metamorfosean con un tamaño corporal más grande tienen una mayor probabilidad de sobrevivir durante la etapa terrestre, pueden reproducirse antes, y con un tamaño más grande en la primera reproducción (Smith 1987; Semlitsch *et al.*, 1988; Altwegg & Reyer, 2003). Esto representa una ventaja, ya que la fecundidad se encuentra correlacionada de manera significativa y positiva con la

condición corporal de las hembras (Reading & Clarke, 1995), lo cual fue reportado para *P. gracilis* (Camargo *et al.*, 2005b; 2008). En consecuencia, salir del agua con un mayor tamaño, se encuentra relacionado de manera positiva con la aptitud (Altwegg & Reyer, 2003). Por lo tanto, la condición corporal deficiente en los metamorfos de *P. gracilis* expuestos a sedimentos contaminados, podría afectar la aptitud de los individuos, lo cual podría repercutir negativamente a nivel poblacional.

Se concluye que los sedimentos contaminados provenientes del sitio forestal tuvieron efectos adversos a nivel individual (incremento de la mortalidad, alteraciones en el desarrollo, aparición de anomalías morfológicas) y celular (presencia de MN y ANE), sobre las larvas de *Physalemus gracilis* expuestas. Además, la mezcla de herbicidas presentes en los sedimentos potenciaría los efectos tóxicos sobre las larvas expuestas en los mesocosmos. En base a estos resultados, resulta clave monitorear el estado de las poblaciones de anfibios presentes en estos agroecosistemas; y se destaca la necesidad de implementar la gestión de los sedimentos en los cuerpos de agua dentro de sistemas agrícolas.

BIBLIOGRAFÍA

- Altwegg, R., & Reyer, H. U. (2003). Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, 57(4), 872-882.
- ASTM. (2022). Standard Guide for Conducting Whole Sediment Toxicity Tests with Amphibians. E2591-22. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, Pennsylvania, USA.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Junges, C. M., & Basso, A. (2014). Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 186, 635-649.
- Ayres, M., Ayres, J. R. M., Ayres, D. L., & Santos, A. S. (2007). BioEstat 5.0-aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. Brasília: CNPq.
- Babini, M. S., Bionda, C. D. L., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2016). Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-14.
- Bach, N. C., Natale, G. S., Somoza, G. M., & Ronco, A. E. (2016). Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 23959-23971.
- Baeza, S., & Paruelo, J. M. (2020). Land use/land cover change (2000–2014) in the Rio de la Plata grasslands: an analysis based on MODIS NDVI time series. *Remote sensing*, 12(3), 381.

- Baker, J., & Waights, V. (1993). The effect of sodium nitrate on the growth and survival of toad tadpoles (*Bufo bufo*) in the laboratory. *Herpetological Journal*, 3(4), 147-148.
- Băncilă, R. I., Hartel, T., Plăiașu, R., Smets, J., & Cogălniceanu, D. (2010). Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amphibia-Reptilia*, 31(4), 558-562.
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., & Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 45-54. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.10.012.
- Benvindo-Souza, M., Oliveira, E. A. S., Assis, R. A., Santos, C. G. A., Borges, R. E., e Silva, D. D. M., & de Souza Santos, L. R. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240, 124910.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., & Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic toxicology*, 78, S93-S98. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.02.015.
- Boone, M. D., and S. M. James. (2005). Use of aquatic and terrestrial mesocosms in ecotoxicology. *Applied Herpetology*, 2:231–257.
- Brand, A. B., Snodgrass, J. W., Gallagher, M. T., Casey, R. E., & Van Meter, R. (2010). Lethal and sublethal effects of embryonic and larval exposure of *Hyla versicolor* to stormwater pond sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(2), 325-331.
- Brodeur, J. C., Poliserpi, M. B., & Sánchez, M. (2014). Synergy between glyphosate-and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, 112, 70-76.
- Brown DD, Cai LQ (2007) Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology* 306: 20-33.
- Burton Jr, G. A., & Pitt, R. (2001). *Stormwater effects handbook: A toolbox for watershed managers, scientists, and engineers*. CRC Press.
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58(9), 1255-1267.
- Camargo, A., Naya, D. E., Canavero, A., da Rosa, I., Maneyro, R., & Naya, D. A. (2005)b. Seasonal activity and the body size—fecundity relationship in a population of *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Anura, Leptodactylidae) from Uruguay. In *Annales Zoologici Fennici*, 42, 513-521.
- Camargo, J. A., & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*, 16(2).
- Camargo, A., Sarroca, M., & Maneyro, R. (2008). Reproductive effort and the egg number vs. size trade-off in *Physalaemus frogs* (Anura: Leiuperidae). *Acta oecologica*, 34(2), 163-171.
- Cárcamo, M.I. (2020). Los Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAP) en Uruguay. RAPAL-Uruguay.

- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123-2136.
- Carreira, S. & Maneyro, R. (2015). *Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay*. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo.
- Cauble, K., & Wagner, R. S. (2005). Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2005; 75:429- 435. Doi: 10.1007/s00128-005-0771-3.
- Cavas, T., Garanko, N. N., & Arkhipchuk, V. V. (2005). Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, 43(4), 569-574.
- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C., Attademo, M. A., Seib, S., Simoniello, M. F., & Lajmanovich, R. C. (2017). Altered development, oxidative stress and DNA damage in *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) larvae exposed to poultry litter. *Ecotoxicology and environmental safety*, 143, 62-71.
- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Sandoval, M. T., & Lajmanovich, R. C. (2019). Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2, 4-D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230, 1-15.
- Cuzzziol Boccioni, A. P., Lener, G., Peluso, J., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Aronzon, C., ... & Lajmanovich, R. C. (2022). Comparative assessment of individual and mixture chronic toxicity of glyphosate and glufosinate ammonium on amphibian tadpoles: A multibiomarker approach. *Chemosphere*, 309, 136554.
- Denver, R. J. (1997). Environmental stress as a developmental cue: corticotropin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Hormones and behavior*, 31(2), 169-179.
- De Liguoro, M., Bona, M. D., Gallina, G., Capolongo, F., Gallochio, F., Binato, G., & Di Leva, V. (2014). A monitoring of chemical contaminants in waters used for field irrigation and livestock watering in the Veneto region (Italy), using bioassays as a screening tool. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 3546-3557.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de transferencia InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455:81-95.
- Fojut, T. L., Vasquez, M. E., Poulsen, A. H., & Tjeerdema, R. S. (2012). Methods for deriving pesticide aquatic life criteria for sediments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume*, 224, 97-175.
- Fort, D. J., Rogers, R. L., Morgan, L. A., Miller, M. F., Clark, P. A., White, J. A., ... & Stover, E. L. (2000). Preliminary validation of a short-term morphological assay to evaluate adverse effects on amphibian metamorphosis and thyroid function using *Xenopus laevis*. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 20(5), 419-425.
- Fonseca, C. R., Ganade, G., Baldissera, R., Becker, C. G., Boelter, C. R., Brescovit, A. D., ... & Vieira, E. M. (2009). Towards an ecologically-sustainable forestry in the Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 142(6), 1209-1219.

- Gilliom, R. J., Barbash, J. E., Crawford, C. G., Hamilton, P. A., Martin, J. D., Nakagaki, N., Nowell, L. H., Scott, J. C., Stackelberg, P. E., Thelin, G. P. & Wolock, D. M. (2006). Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992–2001: U.S. Geological Survey Circular 1291, The Quality of Our Nation's Waters, 184 p., <https://pubs.er.usgs.gov/publication/cir1291>.
- González Ortega, E., & Fuentes Ponce, M. H. (2022). Dinámica del glifosato en el suelo y sus efectos en la microbiota. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 38.
- Gosner, K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetology*, 16:183-190.
- Gripp, H. S., Freitas, J. S., Almeida, E. A., Bisinoti, M. C., & Moreira, A. B. (2017). Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 173-179.
- 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.
- Gupta, R. C. (2014). Respiratory toxicity biomarkers. *Biomarkers in Toxicology*, 2014, 216-239.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., ... & Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), 40-50.
- Helbing, C. C., Ovaska, K., & Ji, L. (2006). Evaluation of the effect of acetochlor on thyroid hormone receptor gene expression in the brain and behavior of *Rana catesbeiana* tadpoles. *Aquatic toxicology*, 80(1), 42-51.
- Henao Muñoz, L. M., Montes Rojas, C. M., & Bernal Bautista, M. H. (2015). Acute toxicity and sublethal effects of the mixture glyphosate (Roundup® Active) and Cosmo-Flux® 411F to anuran embryos and tadpoles of four Colombian species. *Revista de Biología Tropical*, 63(1), 223-233.
- Herek, J. S., Vargas, L., Trindade, S. A. R., Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. T. (2020). Can environmental concentrations of glyphosate affect survival and cause malformation in amphibians? Effects from a glyphosate-based herbicide on *Physalaemus cuvieri* and *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 22619-22630.
- Herek, J. S., Vargas, L., Trindade, S. A. R., Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. T. (2021). Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 81, 103516.
- Hoffman, D.J., B.A. Rattner, G.A. Burton Jr. & J. Cairns Jr. (2003). Handbook of Ecotoxicology. 2nd ed., Lewis Publishers CRC Press LLC: USA. 1290 pp.
- Jofre, M. B., & Karasov, W. H. (1999). Direct effect of ammonia on three species of North American anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(8), 1806-1812.

- Johansson, M., Räsänen, K., & Merilä, J. (2001). Comparison of nitrate tolerance between different populations of the common frog, *Rana temporaria*. *Aquatic Toxicology*, 54(1-2), 1-14.
- Josende, M. E., Tozetti, A. M., Alalan, M. T., Mathies Filho, V., da Silva Ximenez, S., da Silva Júnior, F. M. R., & Martins, S. E. (2015). Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators*, 49, 83-87.
- Junges, C.M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A. M., Cabagna-Zenkhusen, M. C. & Basso, A. (2012). Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish–tadpole interaction. *Chemosphere*, 87:1348-1354.
- Krishnamurthy, S. V., & Smith, G. R. (2011). Combined effects of malathion and nitrate on early growth, abnormalities, and mortality of wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. *Ecotoxicology*, 20, 1361-1367.
- Lajmanovich, R. C., Sandoval, M. T., & Peltzer, P. M. (2003). Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed by glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(3), 612– 618.
- Lajmanovich, C.R & Peltzer, P.M. (2008). Plan de monitoreo ambiental para el estudio del impacto de cultivos extensivos de arroz sobre el macrosistema Iberá.
- Lajmanovich, R.C.; Cabagna-Zenkhusen, M.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Peltzer, P.M.; Basso, 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. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769: 7-12.
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Cabagna-Zenkhusen, M. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Maglianese, M., ... & Beccaria, A. J. (2015). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. *Environmental Research*, 136, 205-212.
- Lajmanovich, R. C., Cuzziol Boccioni, A. P., Curi, L. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C., Bassó, A., Colussi, C & Peltzer, P. M. (2021). Técnicas para el relevamiento de anfibios en ambientes contaminados. En: Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina. Pereyra, L., Etchepare, E., & Vaira, M; Editores. Universidad Nacional de Jujuy. Ediunju. Pp 326-347.
- Lavilla, E., Axel Kwet, Magno Vicente Segalla, Jose Langone, Diego Baldo. (2010). *Physalaemus gracilis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010:e.T57258A11610839. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T57258A11610839.en>. Accessed on 15 September 2023.
- López Geta, J. A., Martínez Navarrete, C., Moreno Merino, L., & Navarrete Martínez, P. (1992). *Movimiento de los plaguicidas hacia las aguas subterráneas*. En: La saguas subterráneas y los plaguicidas. Instituto Geológico y Minero de España (IGME). Disponible en: https://aguas.igme.es/igme/publica/libro28/pdf/lib28/4_mov.pdf.
- Macagnan, N., Rutkoski, C.F., Kolcenti, C., Vanzetto, G.V., Macagnan, L.P., Sturza, P.F., Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., 2017. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 20699-20704. 10.1007/s11356-017-9727-5.

- Mahboob, S., Al-Balwai, H. F. A., Al-Misned, F., & Ahmad, Z. (2014). Investigation on the genotoxicity of mercuric chloride to freshwater *Clarias gariepinus*. *Pak. Vet. J*, 34(1), 100-103.
- Maneyro, R. & S. Carreira. (2023). Respuesta de un ensamble de anfibios a la actividad forestal. En: Brazeiro, A (Ed.). *Biodiversidad en paisajes forestados de Uruguay*. 67 - 86 pp. Comisión Sectorial de Investigación Científica (UdelaR), Uruguay.
- Maneyro R. & Carreira S. (2012). *Guía de anfibios del Uruguay*. 2da ed, Colección Ciencia amiga-Ediciones de la Fuga. Montevideo, Uruguay, 207 pp.
- Mann, R. M., & Bidwell, J. R. (2001). The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environmental pollution*, 114(2), 195-205.
- Margolin, B. H., Collings, B. J., & Mason, J. M. (1983). Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments with binomial responses. *Environmental mutagenesis*, 5(5), 705-716.
- Martino, D., Methol, M., Oleaga, A., Pirelli, H., Rodríguez, L., Vidal, L., ... & Kindgard, A. (2008). Cambios en el uso de la tierra. *GEO Uruguay*, 56-117.
- McDiarmid, R. W., & Altig, R. (Eds.). (1999). Tadpoles: the biology of anuran larvae. University of Chicago Press.
- Meintières, S., Biola, A., Pallardy, M., & Marzin, D. (2001). Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. *Mutagenesis*, 16(3), 243-250. DOI: 10.1093/mutage/16.3.243.
- MGAP-DGF. (2021). Cartografía Nacional Forestal 2021. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección General Forestal. Montevideo, Uruguay. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/resultados-cartografia-forestal-2021>.
- MVOTMA. (2002). Guía para el muestreo de suelos en áreas residenciales. 13p.
- Nardo, D., Evia, G., Castiglioni, E., Egaña, E., Galieta, G., Laporta, M., & Chichet, M. E. N. (2015). Determinación de glifosato mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) en el paisaje protegido Laguna de Rocha y su entorno, Uruguay. *Innotec*, (10), 64-70.
- Natale, G. S., Vera-Candioti, J., de Arcaute, C. R., Soloneski, S., Larramendy, M. L., & Ronco, A. E. (2018). Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 471-479.
- Newman, R. A. (1989). Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology*, 70(6), 1775-1787.
- Nikoloff, N., Escobar, L., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2013). Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and chemical toxicology*, 62, 777-781.
- Nosetto, M. D., Jobbágy, E. G., & Paruelo, J. M. (2005). Land-use change and water losses: the case of grassland afforestation across a soil textural gradient in central Argentina. *Global Change Biology*, 11(7), 1101-1117.

- NYCRR [New York Codes, Rules and Regulations]. (2017). Surface water and groundwater quality standards and groundwater effluent limitations. 6 CRR-NY 703.3. Accessible at: [https://govt.westlaw.com/nycrr/Document/I4ed90412cd1711dda432a117e6e0f345?viewType=FullText&originationContext=documenttoc&transitionType=CategoryPageItem&contextData=\(sc.Default\)&bhcp=1](https://govt.westlaw.com/nycrr/Document/I4ed90412cd1711dda432a117e6e0f345?viewType=FullText&originationContext=documenttoc&transitionType=CategoryPageItem&contextData=(sc.Default)&bhcp=1).
- Ohmes, G. A. (1999). Sulfentrazone behavior in surface soil: dissipation, degradation, adsorption and mobility. PhD diss., University of Tennessee. https://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/7478.
- Orton, F., & Routledge, E. (2011). Agricultural intensity in ovo affects growth, metamorphic development and sexual differentiation in the common toad (*Bufo bufo*). *Ecotoxicology*, 20, 901–911.
- Pavan, F. A., Samojeden, C. G., Rutkoski, C. F., Folador, A., Da Fré, S. P., Müller, C., ... & Hartmann, M. T. (2021). Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2, 4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 85, 103637.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sánchez-Hernandez, J. C., Cabagna, M. C., Attademo, A. M., & Bassó, A. (2008). Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(1), 185-197.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Cabagna-Zenkhusen, M. C., Repetti, M. R., & Beldoménico, H. (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. M., Curi, L., Attademo, A. M., Cuzziol Boccioni, A. P., & Lajmanovich, R. C. 2021. Registro de anormalidades macroscópicas y microscópicas en adultos y larvas de anfibios anuros. En: Pareyra, L.; E. Atchepare & M. Vaira (Eds.). *Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina*. 250 - 265 pp.
- Peluso, J., Aronzon, C. M., Acquaroni, M., & Coll, C. S. P. (2020). Biomarkers of genotoxicity and health status of *Rhinella fernandezae* populations from the lower Paraná River Basin, Argentina. *Ecological Indicators*, 117, 106588.
- Pereira, G., Riero, M., Lajmanovich, R. C., & Maneyro, R. 2024. Acute toxicity and genotoxicity of the S-metolachlor-based herbicide Dual Gold® on *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892) tadpoles (Anura: Leptodactyli-dae). *Limnetica*, 43(2), 000-000. DOI: 10.23818/limn.43.19.
- Pérez-Iglesias, J. M., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G. S., & Larramendy, M. L. (2015). Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 15-24.
- Pérez-Iglesias, J. M., Brodeur, J. C. & Larramendy, M. L. (2020). An imazethapyr-based herbicide formulation induces genotoxic, biochemical, and individual organizational effects in *Leptodactylus latinasus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 2131-2143.

- Pollo, F., Bionda, C., Otero, M., Grenat, P., Babini, S., Flores, P., ... & Martino, A. (2019). Morphological abnormalities in natural populations of the common South American toad *Rhinella arenarum* inhabiting fluoride-rich environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 177, 32-38.
- Quintaneiro, C., Soares, A. M., & Monteiro, M. S. (2018). Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. *Chemosphere*, 194:595-601.
- Ray, M. R., Basu, C., Mukherjee, S., Roychowdhury, S., & Lahiri, T. (2005). Micronucleus frequencies and nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of firefighters. *International Journal of Human Genetics*, 5(1), 45-48. DOI: 10.1080/09723757.2005.11885915.
- 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, 453-459.
- Rowe, C. L., Kinney, O.M., Fiori, A. P., & Congdon, J. D. (1996). Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. *Freshwater Biology*, 37, 723-730.
- Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Folador, A., Skovronski, V. J., do Amaral, A. M., Leitemperger, J., ... & Hartmann, M. T. (2020). Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Chemosphere*, 250, 126162.
- Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Folador, A., Skovronski, V. J., do Amaral, A. M., Leitemperger, J. W., ... & Hartmann, M. T. (2021). Cypermethrin-and fipronil-based insecticides cause biochemical changes in *Physalaemus gracilis* tadpoles. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 4377-4387.
- Samojeden, C. G., Pavan, F. A., Rutkoski, C. F., Folador, A., da Fré, S. P., Müller, C., ... & Hartmann, M. (2022). Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). *Scientific reports*, 12(1), 11926.
- Sansíñena, J. A., Peluso, L., Costa, C. S., Demetrio, P. M., Mac Loughlin, T. M., Marino, D. J., ... & Natale, G. S. (2018). Evaluation of the toxicity of the sediments from an agroecosystem to two native species, *Hyaella curvispina* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) and *Boana pulchella* (AMPHIBIA: ANURA), as potential environmental indicators. *Ecological indicators*, 93, 100-110.
- Sansíñena, J.A. (2020). Estudio de calidad ambiental con larvas de anfibios como bioindicadoras. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Argentina.
- Santos, T. G. (2022). Girinos do Pampa. Base de dados eletrônica acessível em: <https://girinosdopampa.com>. Versão 1.0 (Data de acesso).
- Semlitsch, R. D., & Caldwell, J. P. (1982). Effects of density of growth, metamorphosis, and survivorship in tadpoles of *Scaphiopus holbrookii*. *Ecology*, 63(4), 905-911.
- Semlitsch, R. D., Scott, D. E., & Pechmann, J. H. (1988). Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology*, 69(1), 184-192.

- Smith, D. C. (1987). Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology*, 68(2), 344-350.
- Snodgrass, J. W., Casey, R. E., Joseph, D., & Simon, J. A. (2008). Microcosm investigations of stormwater pond sediment toxicity to embryonic and larval amphibians: variation in sensitivity among species. *Environmental pollution*, 154(2), 291-297.
- Soloneski, S., Ruiz de Arcaute, C., & Larramendy, M. L. (2016). Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba-and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 17811-17821.
- Soutullo, A., Ríos, M., Zaldúa, N., & Teixeira-de-Mello, F. (2020). Soybean expansion and the challenge of the coexistence of agribusiness with local production and conservation initiatives: pesticides in a Ramsar site in Uruguay. *Environmental Conservation*, 47(2), 97-103.
- Teplitsky, C., Plénet, S., & Joly, P. (2003). Tadpoles' responses to risk of fish introduction. *Oecologia*, 134, 270-277.
- USEPA. (1996). Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS850.1800. Tadpole/sediment Subchronic Toxicity Test. EPA 712-C-96-132. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances.
- USEPA. (1997). Volunteer Stream Monitoring: A Methods Manual. EPA 841-B-97-003. Office of Water 4503F, Washington, 227 pp. Accessible at: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/stream.pdf>.
- USEPA. (2000). Ambient water quality criteria recommendations. Information supporting the development of state and tribal nutrient criteria. EPA 822-B-00-016. Office of Water 4304, Washington, 104 pp. Accessible at: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/20003FVH.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2000+Thru+2005&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C00thru05%5Ctxt%5C00000004%5C20003FVH.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>.
- USEPA. (2005). Conductivity. Monitoring and assessing water quality (Online). Accessible at: <https://archive.epa.gov/water/archive/web/html/vms59.html>.
- Vanzetto, G. V., Slaviero, J. G., Sturza, P. F., Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Kolcenti, C., ... & Hartmann, M. T. (2019). Toxic effects of pyrethroids in tadpoles of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Ecotoxicology*, 28(9), 1105-1114.
- Veldman, J. W., Overbeck, G. E., Negreiros, D., Mahy, G., Le Stradic, S., Fernandes, G. W., ... & Bond, W. J. (2015). Tyranny of trees in grassy biomes. *Science*, 347(6221), 484-485.
- Venesky, M. D., Wassersug, R. J., & Parris, M. J. (2010). How does a change in labial tooth row number affect feeding kinematics and foraging performance of a ranid tadpole (*Lithobates sphenoccephalus*)? *The Biological Bulletin*, 218(2), 160-168.

- Warton, D. I., I. J. Wright, D. S. Falster, and M. Westoby. (2006). Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Reviews* 81(2):259-291. <https://doi.org/10.1017/S1464793106007007>.
- Wells, K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis*, Fifth Edition, Prentice Hall, 944 pp.

CAPÍTULO 3. Toxicidad aguda y genotoxicidad del herbicida Dual Gold®, a base de S-metolachloro sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae).

Artículo titulado “*Acute toxicity and genotoxicity of the S-metolachlor-based herbicide Dual Gold® on Leptodactylus luctator (Hudson, 1892) tadpoles (Anura: Leptodactylidae)*”, aceptado para su publicación en la Revista *Limnetica*, DOI: 10.23818/limn.43.19. El artículo se adjunta en el Anexo II.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental provocada por el creciente uso de agroquímicos (AQ) se encuentra entre las principales causas propuestas para explicar el fenómeno de disminución global masiva observado en las poblaciones de anfibios (IUCN, 2022). Frecuentemente, los pesticidas utilizados en agricultura y sus metabolitos, son detectados en cuerpos de agua superficiales (ej. Gilliom *et al.*, 2006; De Liguoro *et al.*, 2014; Nardo *et al.*, 2015), donde pueden persistir y provocar efectos adversos a organismos acuáticos no blanco (Zhelev *et al.* 2018). Los anuros son particularmente sensibles a la contaminación acuática, ya que en este medio comúnmente ocurre el amplexo, la oviposición; y transcurren las primeras etapas (y más críticas) de su ciclo de vida (desarrollo embrionario y larval) (Wells, 2007). Además, poseen una piel delgada y permeable, que posibilita el ingreso de contaminantes, y presentan una alta tasa de bioacumulación (Unrine *et al.*, 2007). Por su gran sensibilidad frecuentemente son utilizados como bioindicadores de la salud del ambiente (i.e. Attademo *et al.*, 2005; Peltzer *et al.*, 2013; Eterovick *et al.*, 2016; Saccol *et al.*, 2017; Bionda *et al.*, 2018).

Un abordaje experimental utilizado en anfibios para obtener información de dosis/respuesta, son los bioensayos de exposición a Agroquímicos (Pérez-Iglesias *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2019; Lajmanovich *et al.*, 2022). Para detectar las consecuencias biológicas de la exposición a contaminantes químicos, se utilizan los biomarcadores de respuesta o efecto tóxico (Lajmanovich *et al.*, 2021), como las alteraciones en la morfología de las células sanguíneas y la actividad enzimática (Attademo *et al.*, 2014; Lajmanovich *et al.*, 2014; Gripp *et al.*, 2017). Uno de los indicadores más destacados de daño en el material genético, es la presencia de Micronúcleos (MN) en glóbulos rojos (Lajmanovich *et al.*, 2005). Otras anormalidades nucleares diferentes a los MN que son consideradas como indicadoras de genotoxicidad son las aberraciones nucleares de los eritrocitos (ANE) (Carrasco *et al.*, 1990). En anfibios, son crecientes las evaluaciones de genotoxicidad mediante el reconocimiento de estos biomarcadores (MN y ANE) (Pollo *et al.*, 2015; Pérez-Iglesias *et al.*, 2015; Lajmanovich *et al.*, 2018, Benvindo-Souza *et al.*, 2020), utilizando técnicas como el Test de Micronúcleos (Schmidt, 1975).

El S-metolaclo (SM) (CAS 87392-12-9) es un herbicida selectivo del grupo de las cloroacetamidas, (Lewis *et al.*, 2016; PAN Pesticide Database, 2022), que es absorbido por raíces y brotes; y tiene efectos inhibitorios de la división y el crecimiento celular (Valloton *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2016). Presenta un alto potencial de bioacumulación, es moderadamente móvil en el ambiente; tiene una baja volatilidad; y su solubilidad en agua y persistencia en suelo es moderada (Lewis *et al.*, 2016; Observatorio Ambiental Nacional, 2022), lo cual favorece su escorrentía hacia cuerpos de agua superficiales. Además, es considerado un importante contaminante de aguas subterráneas (PAN Pesticide Database, 2022). Los efectos del SM se evaluaron en peces (Quintaneiro *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2022); cangrejos (Velisek *et al.*, 2019; Stara *et al.*,

2019); crustáceos (Liu *et al.*, 2006); y moluscos bivalvos (Mai *et al.*, 2013). En relación con los anfibios, existen trabajos disponibles acerca de los efectos tóxicos del Metolacloro sobre embriones de *Xenopus laevis* (Osano *et al.*, 2002); y larvas de *Lithobates Catesbeianus* (Wan *et al.*, 2006); y también se han evaluado alteraciones a nivel endócrino en individuos adultos de *Lithobates pipiens* y *Lithobates clamitans* (McDaniel *et al.*, 2008). Estudios previos también han evaluado los efectos crónicos del SM sobre larvas de *Anaxyrus americanus*, *Pseudacris triseriata* y *Dryophytes versicolor* (Williams *et al.*, 2010); y sobre embriones de *Pelophylax perezi* (Quintaneiro *et al.*, 2018). Paunescu *et al.* (2018) evaluaron los efectos del herbicida DG[®] a base de SM y reportaron diversas alteraciones en adultos de *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) expuestos al herbicida, como lesiones hepáticas, hiperglucemia y una disminución en el número de eritrocitos. Más recientemente, de Arcaute *et al.* (2020) estudiaron la toxicidad aguda y las interacciones entre mezclas equitóxicas y no equitóxicas de los herbicidas Credit[®] (basado en glifosato) y Twin Pack Gold[®] (formulado con flurocloridona y SM) en renacuajos de *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) y encontraron que la toxicidad de las mezclas variaba desde ser aditiva hasta ser ligeramente antagonista.

Dado que, debido a su mayor actividad herbicida (Shaner *et al.*, 2006), el isómero S del Metolacloro es uno de los compuestos más ampliamente utilizados en la agricultura a nivel mundial (Atwood & Paisley-Jones, 2017), se necesitan estudios adicionales para evaluar sus efectos en los renacuajos de anfibios. En Uruguay, el SM se utiliza principalmente en cultivos en barbecho, como soja, eucaliptos, maíz, sorgo y maní. La cantidad de ingrediente activo de SM importado aumentó de 222,336 kg en 2014 a 538,369 kg en 2020. Está clasificado como un pesticida prioritario para la gestión ambiental (Observatorio Ambiental Nacional, 2022). A nivel regional, se ha detectado la presencia de Metolacloro y SM en sedimentos, así como en aguas superficiales y subterráneas, en áreas con actividad agrícola (Andrade *et al.*, 2021; Vera-Candioti *et al.*, 2021; Lajmanovich *et al.*, 2023; Van Opstal *et al.*, 2023). A pesar del papel central de la actividad agrícola en el Bioma Pampa (Baeza *et al.*, 2022), solo se conoce un estudio que evalúa el efecto de mezclas de herbicidas, que incluye una formulación con SM y otro ingrediente activo, en anfibios regionales (de Arcaute *et al.*, 2020). Sin embargo, no existen estudios que evalúen los efectos de formulaciones comerciales basadas únicamente en SM en anfibios Pampeanos.

El objetivo de este estudio fue evaluar la letalidad, y los efectos genotóxicos del herbicida DG[®], a base de S-metolacloro, sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae), utilizando bioensayos de toxicidad aguda. Nuestros objetivos específicos fueron: 1. Determinar la concentración letal media (CL₅₀_{24h}) del SM en larvas de *L. luctator*; 2. Evaluar la frecuencia de los MN y ANE en eritrocitos de sangre periférica en las larvas de *L. luctator*.

Hipótesis:

El herbicida DG[®] tiene efectos genotóxicos sobre larvas de anfibios.

Predicción:

Se encontrará una mayor frecuencia de MN y ANE en larvas expuestas al herbicida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

Se utilizó la formulación comercial del herbicida Dual Gold[®] 960 EC (DG[®]) (87.3% S-metolachlor ((S)-2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl) acetamide, CAS# 87392-12-9), el cual es comercializado por Syngenta Uruguay S.A. La Ciclofosfamida (CP) (ENDOXAN, 50 mg, del laboratorio Baxter, Alemania), fue utilizada como control positivo. Las concentraciones informadas a lo largo del estudio representan las concentraciones nominales del ingrediente activo SM contenidas en el formulado comercial (DG[®]).

La especie de prueba: *Leptodactylus luctator*

Leptodactylus luctator (Anura: Leptodactylidae), presenta una amplia distribución en el cono sur Sudamericano (Magalhaes *et al.*, 2020). Posee un amplio uso del hábitat; y puede encontrarse en zonas de campo natural, así como en ambientes afectados por la actividad agrícola y forestal (Maneyro & Carreira, 2012). Es considerada una especie muy común y no se encuentra en ninguna categoría de amenaza en las listas rojas regionales (i.e. Carreira & Maneyro, 2015) ni a escala global (Heyer *et al.*, 2010). Trabajos previos han utilizado a esta especie como organismo de prueba en estudios toxicológicos (Araujo *et al.*, 2014; Josende *et al.*, 2015; Lajmanovich *et al.*, 2015; Bach *et al.*, 2016; 2018; Samojeden *et al.*, 2022).

Colecta y mantenimiento de larvas de *Leptodactylus luctator*

Se colectaron manualmente larvas de *Leptodactylus luctator* de un sitio sin actividades agrícolas, ubicado en la zona de Melilla, Montevideo, Uruguay. Luego se trasladaron a un bioterio ubicado en la Facultad de Ciencias, con agua del lugar. Las larvas (n=300) fueron colectadas con el permiso de la "Dirección Nacional de Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos" (código EM2022/36001/003604), del "Ministerio de Ambiente" (Montevideo, Uruguay). La longitud corporal promedio de las larvas fue de 9.7 ± 0.7 (8.4-11.5) mm; y la masa fue de 0.13 ± 0.02 (0.09-0.18) g; y se encontraban en el estadio GS 25-28 según Gosner (Gosner, 1960). Las larvas se aclimataron durante 48 h, en acuarios de 20 L conteniendo agua de grifo previamente filtrada (filtro PSA, modelo senior 3) y declorada (pH=7,6 $\pm$ 0.4; conductividad=374 $\pm$ 22 μ Ss-1; oxígeno disuelto=8.4 $\pm$ 0.9 mg L-1; temperatura=19 $\pm$ 1.3°C), con aireación

artificial constante; a un fotoperíodo de 12:12 horas luz/oscuridad; y a una temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Fueron alimentadas *ad libitum* con lechuga hervida (*Lactuca sativa*) hasta el comienzo de los bioensayos (Lajmanovich *et al.*, 2014).

Diseño experimental

Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos de experimentación aprobados por la "Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República" (protocolos número 474 y 684).

Bioensayos de CL₅₀

A partir del rango de concentraciones determinado con pruebas exploratorias, utilizando un factor de dilución (FD) de 1,25; se obtuvieron las concentraciones a testar en las pruebas de toxicidad aguda de 24 horas, para determinar la concentración letal media (CL₅₀_{24h}); la concentración sin efecto observado (NOEC) y la concentración con efecto observado más baja (LOEC). Las larvas fueron expuestas a cinco concentraciones nominales de SM: T1=5.0 mg/L; T2=6.2 mg/L; T3=7.8 mg/L; T4=9.8mg/L; y T5=12.2 mg/L; y a un control (C) negativo con agua de filtro dechlorada. Las diluciones se hicieron a partir de una solución madre de 585 mg/L de SM con agua de filtro dechlorada. Se utilizaron frascos de vidrio de un litro de capacidad que contenían 500 mL de solución de prueba, y se realizaron tres réplicas por tratamiento, con cinco larvas por réplica. Cada frasco fue distribuido al azar. La mortalidad se registró a las 24 horas y se determinó por la ausencia de movimiento al tocar a los renacuajos con una vara de plástico, así como por cambios en su color y apariencia (Bach *et al.*, 2016). Los individuos muertos fueron retirados inmediatamente y fijados en formalina al 10%.

Genotoxicidad

Para determinar el potencial genotóxico del herbicida, se llevaron a cabo experimentos agudos de 96 horas. Los renacuajos fueron expuestos a tres concentraciones nominales diferentes de SM (NOEC/5=Ta; NOEC=Tb y LOEC=Tc), así como a agua de grifo dechlorada como control negativo, y a 40 mg/L de CP como control positivo (Lajmanovich *et al.*, 2005; Pérez-Iglesias *et al.*, 2015). Todas las soluciones de prueba y controles se prepararon por triplicado inmediatamente antes de su uso y se reemplazaron cada 48 h, de acuerdo con las pautas establecidas por la USEPA (1975). Los experimentos se llevaron a cabo en recipientes de vidrio de 3 litros que contenían 2 litros de la solución de prueba. Se colocaron 10 larvas en cada recipiente/réplica (n=150). Se registró la mortalidad cada 24 horas.

Durante los bioensayos de LC50 y los experimentos de genotoxicidad, las larvas no fueron alimentadas, y se monitorearon el pH, el oxígeno disuelto (mg/L), la conductividad y la temperatura del agua de acuerdo con las recomendaciones de la USEPA (1975).

Análisis de genotoxicidad: Test de MN

Se extrajo sangre de doce larvas al azar por tratamiento (4 por réplica), a las 48 y 96 hs de exposición, y se prepararon por duplicado frotis sobre portaobjetos limpios. Las larvas fueron sacrificadas siguiendo los protocolos experimentales aprobados por la Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (protocolos número 474 y 684).

Los frotis se fijaron con alcohol absoluto, y se tiñeron mediante el método de tinción de May-Grünwald Giemsa (MGG) (Barni *et al.*, 2007; Lajmanovich *et al.*, 2014). La frecuencia de micronúcleos (MN) y de aberraciones nucleares (ANE), se determinó en 1000 eritrocitos por cada larva, utilizando un microscopio óptico de campo claro (Olympus BX41) bajo una magnificación de 1000X (Lajmanovich *et al.*, 2005). Los portaobjetos codificados y aleatorizados fueron puntuados a ciegas por un solo observador. Los frotis de sangre se fotografiaron usando una cámara Evolution vf cooled color, y las imágenes fueron procesadas utilizando el Software ImageJ (National Institute of Health, USA).

Para la correcta identificación de MN, nos basamos en los criterios abordados por Fenech (2000) y Meintières *et al.* (2001). Entre estos criterios se destacan que los MN son morfológicamente idénticos, pero más pequeños que el núcleo celular principal (diámetro inferior a 1/3 del núcleo principal); que su intensidad de tinción es similar a la del núcleo principal; que no se encuentran conectados, ni se superponen con el núcleo principal; y que se ubican dentro del citoplasma. Las anomalías o aberraciones nucleares de los eritrocitos maduros (ANE) se clasificaron en: núcleos lobados (LN); núcleos en forma de riñón (K); núcleos picnóticos (PN), núcleos con muescas (NN); núcleos ampollados (BbN); núcleos con brotes (BN); eritoplástidos o eritrocitos anucleados (EP); y células binucleadas (BE) (Carrasco, 1990; Guilherme *et al.*, 2008; Lajmanovich *et al.*, 2014; 2015). La frecuencia de ANE se expresó como el valor medio (‰) de la suma de todos los tipos de aberraciones individuales observadas (Lajmanovich *et al.*, 2014). Las frecuencias de MN y de ANE se evaluaron y compararon con el control positivo (40 mg/L CP) y negativo (agua filtrada y declorada).

Análisis de datos

Se determinó el valor de CL50 y sus intervalos de confianza del 95% utilizando el método no paramétrico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977). Los valores de NOEC y LOEC fueron calculados utilizando el paquete “mixtox” del

Software R (Zhu & Cheen, 2016). Para corroborar la asociación entre la mortalidad y las concentraciones de prueba se efectuaron análisis de regresión lineal entre estas variables. Las frecuencias de MN y de ANE se determinaron a las 48 y 96 h después del tratamiento inicial; y se expresaron como la media $\pm$ el error estándar. Los datos de MN y ANE se analizaron utilizando el test de proporción binomial (Margolin *et al.*, 1983). Para comprobar si existen cambios en las respuestas genotóxicas a las mismas concentraciones del herbicida en función del tiempo de exposición, se comparó la frecuencia de MN y de ANE entre tratamientos a las 48 y 96 h, utilizando el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Los análisis estadísticos fueron realizados con el Software PAST (Paleontological STatistics) versión 2.17c (Hammer *et al.*, 2001); BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007); y R versión 4.2.2 (R Core Team, 2022). Para probar la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos, se utilizaron las pruebas de Levene y de Shapiro-Wilk (SW), respectivamente. El nivel de significancia se estableció a $\alpha=0.05$.

RESULTADOS

En ninguno de los dos ensayos (CL50_{24h} y genotoxicidad), se observaron individuos muertos en los controles negativos. La CL50_{24h} (límites de confianza del 95%) fue de 7.0 mg/L (6.6-7.4) de SM. El valor de NOEC fue de 5.0 mg/L; mientras que el de LOEC fue de 6.2 mg/L de SM. Se encontró una correlación positiva y significativa entre la mortalidad y la concentración del herbicida de estudio ($R^2=0.74$; $p<0.05$). La concentración más alta (12.2 mg/L de SM), mató a todos los renacuajos a las 24 h de exposición. En el ensayo de genotoxicidad no se registró mortalidad en los controles positivos, ni en los tratamientos Ta (1 mg/L SM); y Tb (5.0 mg/L SM), tanto a las 48 como a las 96 h de exposición. Tampoco se registró mortalidad de individuos en el tratamiento Tc (6.2 mg/L de SM) a las 48 h. En cambio, la mortalidad a la concentración más alta fue del 89% a las 96 h, y por este motivo el tratamiento Tc no fue incluido en los análisis de genotoxicidad a este tiempo de exposición.

Las larvas de *Leptodactylus luctator* presentaron eritrocitos maduros de forma oval, con un núcleo ubicado en posición central, de límite bien definido (Fig. 1A). Los MN fueron identificados fácilmente en el citoplasma celular, como pequeños fragmentos de forma esférica más pequeños que el núcleo principal y siempre separados de este (Figura 1G). Se observaron células apoptóticas (AP), en vías de destrucción o muerte celular en larvas expuestas al herbicida de estudio (Figura 1K). También se identificaron células en mitosis (M) (Figura 1L). En la figura 2 se muestran las frecuencias de MN y sus respuestas en función del tiempo de exposición a las distintas concentraciones de SM evaluadas. Podemos notar que, a mayor concentración del herbicida, mayor es la frecuencia de eritrocitos micronucleados en las larvas de *L. luctator*, tanto a las 48 como a las 96 h de exposición. La frecuencia de MN para el

tratamiento Ta (1 mg/L SM), no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo control negativo a las 48 h (Figura 2). No obstante, las diferencias entre estos dos tratamientos fueron significativas a las 96 h. Para el resto de las concentraciones de prueba, incluido el control positivo (40 mg/L de CP), las frecuencias de MN fueron significativamente mayores que en el grupo de control negativo tanto a las 48 como a las 96 h (Figura 2).

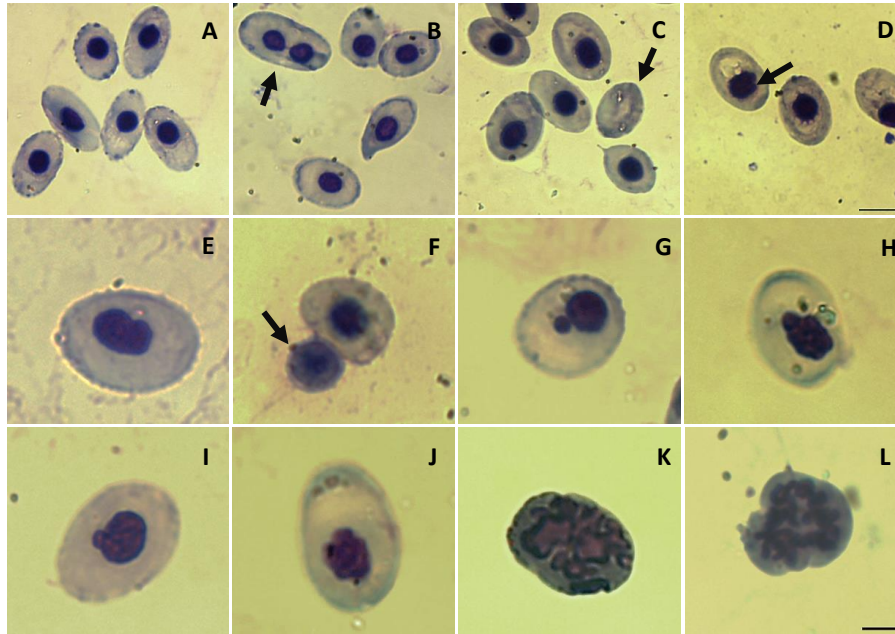


Figura 1. Detalle de eritrocitos observados en larvas de *Leptodactylus luctator* expuestas al herbicida DG®, a base de S-metolaclo. (A) eritrocitos normales; (B) célula binucleada (BE); (C) eritroplástido o eritrocito anucleado (EP); (D) núcleos con muescas (NN); (E) núcleo en forma de riñón (K); (F) núcleo picnótico (PN); (G) Micronúcleo (MN); (H) núcleo lobado (LN); (I) núcleo con brote (BN); (J) núcleo ampollado (BbN); (K) célula apoptótica (AP); (L) eritrocito en mitosis (M). May Grünwald-Giemsa, 100x. La barra negra en la imagen D representa una escala de 10 µm (imágenes A-D). La barra negra en la imagen L representa una escala de 5 µm (imágenes E-L).

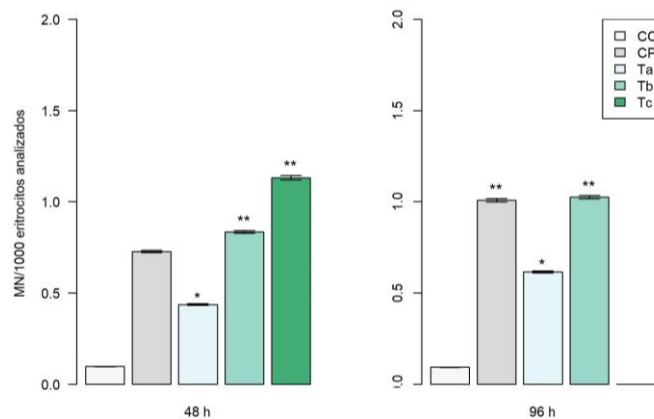


Figura 2. Frecuencia de micronúcleos (MN) (por 1000 células) en larvas de *Leptodactylus luctator* expuestas a diferentes concentraciones del herbicida DG®, a base de S-metolacolor. CO: control negativo (0 mg/L SM); CP: control positivo (40 mg/L de ciclofosfamida); Ta=1 mg/L SM; Tb=5.0 mg/L SM; Tc=6.2 mg/L SM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$: diferencias significativas con respecto al control negativo (Test de proporción binomial).

Además de los MN, pudimos identificar la presencia de distintas aberraciones nucleares en los eritrocitos (ANE) de las larvas expuestas al herbicida (Figura 1). También observamos un incremento en la frecuencia de ANE a mayor concentración de S-metolacolor, tanto a las 48 como a las 96 h de exposición (Figura 3). Todos los tratamientos de prueba mostraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de ANE con el grupo control negativo, en ambos tiempos de exposición evaluados (Figura 3). Además, se observaron diferencias significativas en la frecuencia de ANE a las 48 y 96 h, entre larvas expuestas a CP y el grupo de control negativo. Las frecuencias de cada tipo de ANE por tratamiento a las 48 h y 96 h se encuentran en la Tabla 1. Podemos notar que, a las 48 h de exposición, las frecuencias de ANE se encontraban en el siguiente orden: NN>EP>K>LN>AP>BbN>BE>BN>PN. Por otra parte, a las 96 h, el orden fue el siguiente: EP>BE>LN>NN>BN>K>BbN>PN>AP.

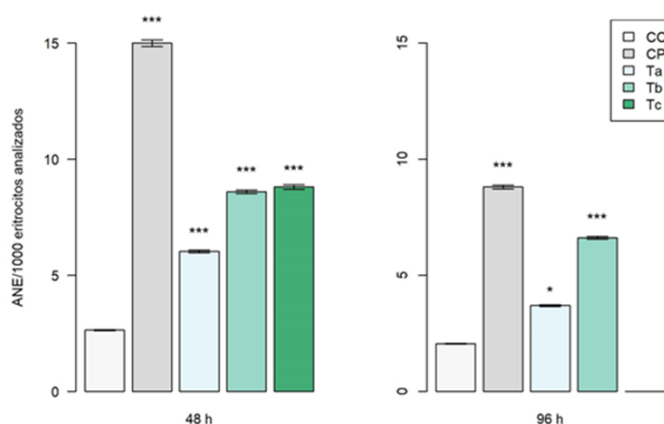


Figura 3. Frecuencia de Aberraciones nucleares en los eritrocitos (ANE) (por 1000 células) en larvas de *Leptodactylus luctator* expuestas a diferentes concentraciones del herbicida DG®, a base de S-metolacolor. CO: control negativo (0 mg/L SM); CP: control positivo (40 mg/L de ciclofosfamida); Ta=1 mg/L SM; Tb=5.0 mg/L SM; Tc=6.2 mg/L SM. * $p<0.05$; *** $p<0.001$: diferencias significativas con respecto al control negativo (Test de proporción binomial).

Tabla 1. Frecuencia (%) de distintos tipos de aberraciones nucleares en eritrocitos (ANE) de larvas de *L. luctator* expuestas a diferentes concentraciones de S-Metolachlor (media $\pm$ SE). CO: control negativo (0 mg/L SM); CP: control positivo (40 mg/L de ciclofosfamida); Ta=1 mg/L SM; Tb=5.0 mg/L SM; Tc=6.2 mg/L SM; BE: núcleos binucleados; K: núcleos en forma de riñón; EP: eritoplástidos o eritrocitos anucleados; BN: núcleos con brotes; LN: núcleos lobados; BbN: núcleos ampollados; NN: núcleos con muescas; PN: núcleos picnóticos; AP: célula apoptótica. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$: diferencias significativas con respecto al control negativo (Test de proporción binomial).

ANE	h	Tratamiento				
		CO	CP	Ta	Tb	Tc
BE	48	0.78 ±0.01	2.72 ±0.02**	1.05 ±0.01	0.83 ±0.01	0.38 ±0.004
K		0.58 ±0.01	2.18 ±0.02**	1.14 ±0.01	1.67 ±0.02**	0.50 ±0.01
EP		0.39 ±0.004	2.72 ±0.02***	0.61 ±0.01	1.42 ±0.01**	1.89 ±0.02**
BN		0	0.54 ±0.005	0.44 ±0.004	0.33 ±0.003	0.25 ±0.003
LN		0.39 ±0.004	1.64 ±0.02**	0.96 ±0.01	0.92 ±0.01	1.26 ±0.01*
BbN		0.19 ±0.002	1.09 ±0.01**	0.09 ±0.001	0.50 ±0.01	0.50 ±0.01
NN		0.29 ±0.003	3.27 ±0.03***	1.14 ±0.01*	1.92 ±0.02***	1.76 ±0.02***
PN		0	0.45 ±0.004	0.09 ±0.001	0.33 ±0.003	0.38 ±0.004
AP		0	1.27 ±0.01	0.52 ±0.01	0.67 ±0.01	1.89 ±0.02
BE	96	0.37 ±0.004	1.93 ±0.02***	0.97 ±0.01*	1.03 ±0.01*	-
K		0.28 ±0.003	1.10 ±0.01*	0.09 ±0.001	0.47 ±0.004	-
EP		0.93 ±0.01	1.65 ±0.02	1.49 ±0.01	2.24 ±0.02**	-
BN		0.19 ±0.002	0.73 ±0.01*	0.35 ±0.003	0.47 ±0.004	-
LN		0	0.92 ±0.01	0.53 ±0.005	0.84 ±0.01	-
BbN		0	0.55 ±0.01	0	0.47 ±0.004	-
NN		0.19 ±0.002	1.65 ±0.02***	0.26 ±0.002	0.75 ±0.01*	-
PN		0	0.18 ±0.002	0	0.28 ±0.003	-
AP		0.09 ±0.001	0.09 ±0.001	0	0.09 ±0.001	-

No se observaron diferencias significativas en las frecuencias de micronúcleos (MN) entre las mismas concentraciones de prueba a las 48 y 96 horas de exposición. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de ENA a las 48 y 96 horas en el tratamiento Ta (5.0 mg/L de SM) (U=28; p<0.05) y en el control positivo (40 mg/L de CP) (U=22; p<0.01) (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del Test U de Mann-Whitney entre la frecuencia de Micronúcleos (MN) y de otras aberraciones nucleares en los eritrocitos (ANE) de larvas de *L. luctator*, para los mismos tratamientos a las 48 y 96 h de exposición. CO: control negativo (0 mg/L SM); CP: control positivo (40 mg/L de ciclofosfamida); Ta=1 mg/L SM; Tb=5.0 mg/L SM; Tc=6.2 mg/L SM.

Tratamiento	Anormalidades nucleares	U	p
CO (48/96 h)	MN	72	0.95
CP (48/96 h)		59	0.44
Ta (48/96 h)		70	0.90
Tb (48/96 h)		69	0.96

CO (48/96 h)	ANE	62	0.56
CP (48/96 h)		22	<0.01
Ta (48/96 h)		28	<0.05
Tb (48/96 h)		45	0.12

DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, *Leptodactylus luctator* es una especie común y ampliamente distribuida en el cono sur de América del Sur. Sin embargo, aún son escasos los estudios que han utilizado a este anfibio anuro como organismo de prueba en investigaciones ecotoxicológicas (Ej. Araujo *et al.*, 2014; Josende *et al.*, 2015; Lajmanovich *et al.*, 2015; Bach *et al.*, 2016; 2018; Samojeden *et al.*, 2022). Aunque el SM es uno de los herbicidas más comúnmente utilizados en la agricultura (Atwood & Paisley-Jones, 2017), con un uso frecuente en Uruguay (Observatorio Ambiental Nacional, 2022) y la región (Andrade *et al.*, 2021; Vera-Candioti *et al.*, 2021; Lajmanovich *et al.*, 2023; Van Opstal *et al.*, 2023), su toxicidad y efectos genotóxicos en los renacuajos de *L. luctator* aún no han sido estudiados.

La CL50_{24h} del herbicida DG[®], determinada en este estudio para larvas de *L. luctator*, fue de 7.0 mg/L. Los estudios sobre la toxicidad aguda del SM y formulaciones comerciales a base de SM en renacuajos de anfibios son escasos. Se ha informado un valor de LC50_{24h} de 56 mg/L para la formulación comercial Primextra[®] II (35.8 % SM, 28.7 % de atrazina) en larvas de *Lithobates catesbeianus* (Wan *et al.*, 2006), y un valor de LC50_{192h} de 37.5 mg/L de SM en embriones de la rana común *Pelophylax perezii* (Quintaneiro *et al.*, 2018). Nuestros resultados sugieren que las larvas de *L. luctator* son menos tolerantes al SM que los embriones de *P. perezii*. Las diferencias en la sensibilidad pueden atribuirse a diferencias intrínsecas entre especies, así como a las diferentes etapas de desarrollo evaluadas y a la formulación comercial utilizada en este estudio, que además del ingrediente activo contiene excipientes como surfactantes y solventes que pueden influir en su toxicidad. Estudios previos han demostrado que para varios agroquímicos una formulación comercial puede ser más tóxica que el ingrediente activo por sí solo (Könen & Çava, 2008; Nikoloff *et al.*, 2013; Lajmanovich *et al.*, 2014; Bach *et al.*, 2016). Aunque DG[®] contiene más del doble de la cantidad de SM en su formulación en comparación con Primextra[®] II, no es posible comparar directamente la sensibilidad de las larvas de *L. luctator* con las de *L. catesbeianus*. Esto se debe a que Primextra[®] II, además de SM, contiene otro ingrediente activo, la atrazina, que también puede influir en el nivel de toxicidad de la formulación. Nuestros resultados demuestran la toxicidad aguda del herbicida DG[®] en las larvas de *L. luctator* expuestas. Dado que, en el campo, los pesticidas se aplican en

formulaciones comerciales, se recomienda utilizar estos compuestos para evaluar el riesgo real de los productos agroquímicos.

Estudios previos han reportado un valor de LC50_{24h} de 7.13 (rango: 6.80-7.55) mg/L para Roundup ULTRA MAX[®] (RU[®]), un herbicida basado en glifosato, y un valor de LC50_{48h} de 22.45 (rango: 19.59-25.73) mg/L para el biopesticida *Bacillus thuringiensis var israelensis* (Introbans) en renacuajos de *L. luctator* (Bach *et al.*, 2016; Lajmanovich *et al.*, 2015). El valor de LC50_{24h} obtenido para DG[®] en este estudio es similar al reportado para RU[®], lo que nos permite afirmar que las larvas de *L. luctator* en la etapa GS25 (la etapa evaluada en ambos estudios) presentan un rango de sensibilidad similar a las formulaciones comerciales de ambos herbicidas. Los valores de concentración letal media obtenidos en bioensayos de laboratorio son útiles para comparar los efectos de los agroquímicos en organismos acuáticos no objetivo (Lajmanovich *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta este aspecto y dado que SM es uno de los herbicidas más ampliamente utilizados, se requieren estudios adicionales para evaluar la toxicidad aguda de diferentes formulaciones comerciales de SM, a fin de comparar los rangos de sensibilidad entre especies de anfibios.

Nuestros resultados demuestran que la formulación comercial del herbicida DG[®], a base de S-metolacoloro, induce la formación de micronúcleos (MN) y de otras aberraciones nucleares en los eritrocitos (ANE) de sangre periférica de larvas de *L. luctator*. Las frecuencias de MN y ANE de las larvas expuestas a las distintas concentraciones de prueba y a Ciclofosfamida, fueron significativamente más altas que las del grupo de control negativo, tanto a las 48, como a las 96 h de exposición. Solo para la concentración más baja de SM testada, se reportaron diferencias significativas en la frecuencia de MN con el grupo control negativo recién a las 96 h. Por lo tanto, pudimos comprobar que los efectos genotóxicos de este herbicida se manifiestan dentro de las primeras 48 horas de exposición de las larvas. Resultados similares fueron observados para larvas de *Rhinella arenarum* (GS 29-31), donde las alteraciones genéticas provocadas a concentraciones subletales del herbicida Liberty[®], a base de glufosinato de amonio, se manifestaron en las primeras 48h de exposición (Lajmanovich *et al.*, 2015). En cambio, Pérez-Iglesias *et al.* (2015), encontraron para larvas de *Boana pulchella* (GS 36), que el herbicida Pivot Hs, a base de imazetapir (IMZT); solo incrementa la frecuencia de MN a la concentración subletal más alta ensayada a las 48 h; mientras que recién a las 96 h el herbicida fue capaz de inducir otras ANE, y de mostrar una mayor frecuencia de MN en todas las concentraciones de prueba. La falta de diferencias significativas en la frecuencia de MN entre los mismos tratamientos a las 48 y 96 h; estaría indicando que, a las concentraciones de ensayo, el máximo potencial genotóxico se alcanza en las primeras 48 horas de exposición al herbicida. No obstante, encontramos diferencias significativas en la frecuencia de ANE entre la concentración de prueba más baja (1 mg/L de SM) a las 48 y 96 h de

exposición, lo cual indicaría que el tiempo de exposición incrementaría la citogenotoxicidad a estos niveles de concentración subletal. Este resultado es significativo porque consideramos que la concentración de 1 mg/L de SM es la más relevante entre las concentraciones probadas, ya que es la más cercana a las concentraciones de SM reportadas en entornos agrícolas (15 µg/L de SM) (Van Opstal *et al.*, 2023).

Identificamos nueve tipos distintos de ANE en larvas expuestas a las diferentes concentraciones de prueba, con un predominio de las aberraciones de núcleo con muesca (NN); eritoplástidos (EP); núcleo en forma de riñón (K); célula binucleada (BE) y núcleo lobado (LN). El mecanismo responsable de generar todos los tipos de ANE conocidas aún no se ha explicado completamente, sin embargo, varios estudios previos indican que estas aberraciones se inducen en respuesta a la exposición a agentes genotóxicos (Tolbert *et al.*, 1992; Serrano-García & Montero-Montoya, 2001; Cavas & Ergene-Gözükar, 2005; Bolognesi *et al.*, 2006; Pérez-Iglesias *et al.*, 2015). La falta de criterios uniformes en la literatura para la puntuación de ANE hace difícil la comparación entre resultados (Bolognesi *et al.*, 2006; Guilherme *et al.*, 2008). Según Serrano-García & Montero-Montoya (2001), los fenómenos de gemación o brotes de núcleos celulares y las células binucleadas tienen un origen similar a los micronúcleos y se supone que ambos son sucesos genotóxicos. Apoyando esta idea Bolognesi *et al.* (2006), encontraron una asociación positiva entre la frecuencia de brotes nucleares y MN. Estos autores, además plantean que las invaginaciones nucleares (ej. núcleo en forma de riñón, núcleo con muesca), son anomalías que están asociadas principalmente a citotoxicidad. Cavas & Ergene-Gözükar (2005) sugieren que los núcleos ampollados y lobulados son indicadores de daño genotóxico. Los núcleos picnóticos se encuentran asociados con la apoptosis, por lo cual su prevalencia permite inferir la aparición de muerte celular (Tolbert *et al.*, 1992). Estos aumentan su frecuencia frente a la lesión celular (Ray *et al.*, 2005). Tolbert *et al.* (1992), mencionan que un nivel de apoptosis por encima de los normales estaría indicando una agresión genotóxica. Por otra parte, se plantea que la presencia de glóbulos rojos anucleados o eritoplástidos es más frecuente en la sangre de larvas expuestas a aguas contaminadas, y que surgen como una respuesta para hacer más eficiente el transporte de oxígeno, al mejorar la relación superficie/volumen celular (Barni *et al.*, 2007). En función de lo expuesto anteriormente y de los resultados obtenidos, podemos inferir el potencial citotóxico y genotóxico del herbicida DG[®] a base de SM, sobre larvas de *L. luctator*. Por otra parte, consideramos que la alta frecuencia de células apoptóticas observadas en larvas expuestas a la concentración de 6.2 mg/L de SM a las 48 h, se relacionaría con la alta mortalidad de larvas registrada para este tratamiento a las 96 h de exposición.

El efecto genotóxico y citotóxico de herbicidas a base de S-metolacoloro, como el Twin Pack Gold[®] (96% de ingrediente activo), ha sido comprobado en células del hepatoma humano (HepG2) (Nikoloff *et al.*, 2013). Estos autores demostraron que el

formulado comercial fue capaz de inducir la formación de MN; así como una reducción significativa en la actividad mitocondrial, mientras que el SM puro no tuvo estos efectos. En anfibios, fueron reportados resultados similares por Lajmanovich *et al.*, 2014; para el herbicida glufosinato de amonio y su formulado comercial Liberty®, en larvas de *Rhinella arenarum*. Las diferencias encontradas, indicarían que los ingredientes inertes del formulado jugarían un rol clave en la inducción de genotoxicidad. Por lo tanto, volvemos a destacar la importancia de evaluar las formulaciones comerciales, como se ha realizado en el presente estudio, para no subestimar efectos. Por otra parte, se han comprobado los efectos tóxicos de dosis subletales del DG® (el mismo formulado comercial utilizado en el presente estudio), sobre individuos adultos de *Pelophylax ridibundus*, destacándose las alteraciones a nivel fisiológico, bioquímico e histológico en las ranas expuestas (Paunescu *et al.*, 2018). Nuestros resultados complementan los obtenidos por estos autores, y nos permiten inferir que el herbicida DG® representa un riesgo para los anfibios que habitan en agroecosistemas.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, V. S., Gutierrez, M. F., Regaldo, L., Paira, A. R., Repetti, M. R., & Gagneten, A. M. (2021). Influence of rainfall and seasonal crop practices on nutrient and pesticide runoff from soybean dominated agricultural areas in Pampean streams, Argentina. *Science of the Total Environment*, 788, 147676. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.147676.
- Araújo, C. V., Shinn, C., Moreira-Santos, M., Lopes, I., Espíndola, E. L., & Ribeiro, R. (2014). Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles. *Aquatic toxicology*, 146, 70-75. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.10.030.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., & Lajmanovich, R. C. (2005). Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, ecosystems & environment*, 106(4), 389-394. DOI: 10.1016/j.agee.2004.08.012.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Junges, C. M., & Basso, A. (2014). Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 186, 635-649. DOI: 10.1007/s10661-013-3404-z.
- Atwood, D., & Paisley-Jones, C. (2017). Pesticides industry sales and usage: 2008–2012 market estimates. *US Environmental Protection Agency, Washington, DC*, 20460, 2017-01.
- Ayres, M., Ayres, J. R. M., Ayres, D. L., & Santos, A. S. (2007). BioEstat 5.0-aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. Brasília: CNPq.
- Bach, N. C., Natale, G. S., Somoza, G. M., & Ronco, A. E. (2016). Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole

- frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 23959-23971. DOI: 10.1007/s11356-016-7631-z.
- Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.110.
- Baeza, S., Vélez-Martin, E., De Abelleira, D., Banchero, S., Gallego, F., Schirmbeck, J., ... & Hasenack, H. (2022). Two decades of land cover mapping in the Río de la Plata grassland region: The MapBiomass Pampa initiative. *Remote Sensing Applications: Society and Environment*, 28, 100834. DOI: 10.1016/j.rsase.2022.100834.
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., & Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 45-54. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.10.012.
- Benvindo-Souza, M., Oliveira, E. A. S., Assis, R. A., Santos, C. G. A., Borges, R. E., e Silva, D. D. M., & de Souza Santos, L. R. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240, 124910. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124910.
- Bionda, C. D. L., Babini, S., Martino, A. L., Salas, N. E., & Lajmanovich, R. C. (2018). Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad *Rhinella arenarum* (anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation*, 14, e00398. DOI: 10.1016/j.gecco.2018.e00398.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., & Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic toxicology*, 78, S93-S98. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.02.015.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123-2136. DOI: 10.1139/f90-237.
- Carreira, S. & Maneyro, R. (2015). *Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay*. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo, Uruguay.
- Çavaş, T., & Ergene-Gözükara, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology*, 74(3), 264-271. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.06.001.
- de Arcaute, C. R., Brodeur, J. C., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2020). Toxicity to *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura, Bufonidae) of herbicide mixtures commonly used to treat fallow containing resistant weeds: glyphosate–dicamba and glyphosate–flurochloridone. *Chemosphere*, 245, 125623. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125623.
- De Liguoro, M., Bona, M. D., Gallina, G., Capolongo, F., Gallochio, F., Binato, G., & Di Leva, V. (2014). A monitoring of chemical contaminants in waters used for field

- irrigation and livestock watering in the Veneto region (Italy), using bioassays as a screening tool. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 3546-3557. DOI: 10.1007/s11356-013-2357-7.
- Eterovick, P. C., Sloss, B. L., Scalzo, J. A., & Alford, R. A. (2016). Isolated frogs in a crowded world: Effects of human-caused habitat loss on frog heterozygosity and fluctuating asymmetry. *Biological Conservation*, 195, 52-59. DOI: 10.1016/j.biocon.2015.12.036.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95. DOI: 10.1016/S0027-5107(00)00065-8.
- Freitas, J. S., Giroto, L., Goulart, B. V., Alho, L. D. O. G., Gebara, R. C., Montagner, C. C., ... & Espíndola, E. L. G. (2019). Effects of 2, 4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotoxicology and environmental safety*, 182, 109446. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109446.
- Gilliom, R. J., Barbash, J. E., Crawford, C. G., Hamilton, P. A., Martin, J. D., Nakagaki, N., Wolock, D. M. (2006). Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992–2001: U.S. Geological Survey Circular 1291, The Quality of Our Nation's Waters. <https://pubs.er.usgs.gov/publication/cir1291>. DOI:10.3133/cir1291.
- 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. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.08.016.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
- Gripp, H. S., Freitas, J. S., Almeida, E. A., Bisinoti, M. C., & Moreira, A. B. (2017). Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 173-179. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.10.027.
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., & Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental science & technology*, 11(7), 714-719. DOI: 10.1021/es60130a004.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.
- Heyer, R., Langone, J., La Marca, E., Azevedo-Ramos, C., di Tada, I., Baldo, D., ... & Hardy, J. (2010). *Leptodactylus latrans*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e. T57151A11592655. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed on 23 February 2023.
- IUCN 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed on 23 February 2023.
- Josende, M. E., Tozetti, A. M., Alalan, M. T., Mathies Filho, V., da Silva Ximenez, S., da Silva Júnior, F. M. R., & Martins, S. E. (2015). Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators*, 49, 83-87. DOI: 10.1016/j.ecolind.2014.10.007.

- Könen S., & Çavaş T. (2008). Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49, 434-438. DOI: 10.1002/em.20401.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna, M., Peltzer, P. M., Stringhini, G. A., & Attademo, A. M. (2005). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1-2), 67-72. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.08.001.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Bassó, A., & Lorenzatti, E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 7-12. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2014.04.009.
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Maglianese, M., ... & Beccaria, A. J. (2015). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. *Environmental Research*, 136, 205-212. DOI: 10.1016/j.envres.2014.10.022.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., Attademo, A. M., Colussi, C. L., & Basso, A. (2018). Acute toxicity of colloidal silicon dioxide nanoparticles on amphibian larvae: emerging environmental concern. *International Journal of Environmental Research*, 12, 269-278. DOI: 10.1007/s41742-018-0089-8.
- Lajmanovich, R. C., Cuzziol Boccioni, A. P., Curi, L. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C., Bassó, A., Colussi, C., & Peltzer, P. M. (2021). Técnicas para el relevamiento de anfibios en ambientes contaminados. Pereyra, L., Etchepare, E., & Vaira, M (eds.): In: *Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina*. (pp. 326-347). Universidad Nacional de Jujuy, Argentina.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Lener, G., Boccioni, A. P. C., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., ... & Repetti, M. R. (2022). Glyphosate and glufosinate ammonium, herbicides commonly used on genetically modified crops, and their interaction with microplastics: Ecotoxicity in anuran tadpoles. *Science of The Total Environment*, 804, 150177. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150177.
- Lajmanovich, R. C., Repetti, M. R., Boccioni, A. P. C., Michlig, M. P., Demonte, L., Attademo, A. M., & Peltzer, P. M. (2023). Cocktails of pesticide residues in *Prochilodus lineatus* fish of the Salado River (South America): First record of high concentrations of polar herbicides. *Science of The Total Environment*, 870, 162019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.162019.
- Lewis, K. A., Tzivilakis, J., Warner, D. J., & Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. DOI: 10.1080/10807039.2015.1133242.
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., & Liu, W. (2006). A comparative study of rac-and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), 451-455. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.02.002.

- Liu, S., Wang, L., Chen, K., Yang, H., Ling, M., Wu, L., ... & Bai, L. (2022). Combined effects of S-metolachlor and benoxacor on embryo development in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 238, 113565. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.113565.
- Magalhães, F. D. M., Lyra, M. L., De Carvalho, T. R., Baldo, D., Brusquetti, F., Burella, P., ... & Garda, A. A. (2020). Taxonomic review of South American Butter Frogs: Phylogeny, geographic patterns, and species delimitation in the *Leptodactylus latrans* species group (Anura: Leptodactylidae). *Herpetological Monographs*, 34(1), 131-177. DOI: 10.1655/HERPMONOGRAPHS-D-19-00012.
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., & Cachot, J. (2013). Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 89, 1-8. DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.04.003.
- Maneyro R. & Carreira S. (2012). *Guía de anfibios del Uruguay*. 2da ed, Colección Ciencia amiga-Ediciones de la Fuga. Montevideo, Uruguay.
- Margolin, B. H., Collings, B. J., & Mason, J. M. (1983). Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments with binomial responses. *Environmental mutagenesis*, 5(5), 705-716. DOI: 10.1002/em.2860050509.
- McDaniel, T. V., Martin, P. A., Struger, J., Sherry, J., Marvin, C. H., McMaster, M. E., ... & Tetreault, G. (2008). Potential endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) from areas of intensive row crop agriculture. *Aquatic Toxicology*, 88(4), 230-242. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.05.002.
- Meintières, S., Biola, A., Pallardy, M., & Marzin, D. (2001). Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. *Mutagenesis*, 16(3), 243-250. DOI: 10.1093/mutage/16.3.243.
- Nardo, D., Evia, G., Castiglioni, E., Egaña, E., Galieta, G., Laporta, M., & Chichet, M. E. N. (2015). Determinación de glifosato mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) en el paisaje protegido Laguna de Rocha y su entorno, Uruguay. *Innotec*, (10), 64-70.
- Nikoloff, N., Escobar, L., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2013). Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and chemical toxicology*, 62, 777-781. DOI: 10.1016/j.fct.2013.10.015.
- Observatorio Ambiental Nacional. 2022. Datos abiertos. Datos propios y de otras instituciones vinculadas a la gestión ambiental. Ministerio de Ambiente. Montevideo, Uruguay. <https://www.ambiente.gub.uy/oan/datos-abiertos/>. Accessed on 24 November 2022.
- Osano, O., Admiraal, W., & Otieno, D. (2002). Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(2), 375-379. DOI: 10.1002/etc.5620210221.
- Ossana, N. A., Castañé, P. M., & 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, 486-497. DOI: 10.1007/s00244-013-9920-6.
- PAN Pesticide Database. (2022). Metolachlor, (S). Pesticide Action Network, North America. _Accessed on 24 January 2023.
- Paunescu, A., Soare, L. C., Fierascu, R. C., Fierascu, I., & Ponopal, M. C. (2018). The influence of six pesticides on physiological indices of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 100, 376-383. DOI: 10.1007/s00128-018-2277-9.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Repetti, M. R., ... & Beldoménico, H. (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. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.010.
- Pérez-Iglesias, J. M., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G. S., & Larramendy, M. L. (2015). Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on monteideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 15-24. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.04.045.
- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Natale, G. S., & de Oliveira, C. (2019). Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental pollution*, 244, 733-746. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.10.073.
- Pollo, F. E., Bionda, C. L., Salinas, Z. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2015). Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental monitoring and assessment*, 187, 1-9. doi:10.1007/s10661-015-4802-1.
- Quintaneiro, C., Patrício, D., Novais, S. C., Soares, A. M. V. M., & Monteiro, M. S. (2017). Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos. *Science of the Total Environment*, 586, 390-400. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.153.
- Quintaneiro, C., Soares, A. M., & Monteiro, M. S. (2018). Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. *Chemosphere*, 194, 595-601. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.171.
- R Core Team. (2022). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Accessed on 23 March 2023.
- Ray, M. R., Basu, C., Mukherjee, S., Roychowdhury, S., & Lahiri, T. (2005). Micronucleus frequencies and nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of firefighters. *International Journal of Human Genetics*, 5(1), 45-48. DOI: 10.1080/09723757.2005.11885915.
- Saccol, S. D. S. A., Bolzan, A. M. R., & dos Santos, T. G. (2017). In the shadow of trees: does eucalyptus afforestation reduce herpetofaunal diversity in Southern Brazil?. *South American Journal of Herpetology*, 12(1), 42-56. DOI: 10.2994/SAJH-D-16-00028.1.

- Samojeden, C. G., Pavan, F. A., Rutkoski, C. F., Folador, A., da Fré, S. P., Müller, C., ... & Hartmann, M. (2022). Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). *Scientific Reports*, 12(1), 11926. DOI: 10.1038/s41598-022-16039-z.
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31,9-15. DOI: 10.1016/0165-1161(75)90058-8.
- Serrano - García, L., & Montero - Montoya, R. (2001). Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and molecular mutagenesis*, 38(1), 38-45. DOI: 10.1002/em.1048.
- Shaner, D. L., Brunk, G., Belles, D., Westra, P., & Nissen, S. (2006). Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(7), 617-623. DOI: 10.1002/ps.1215.
- Stara, A., Kubec, J., Zuskova, E., Buric, M., Faggio, C., Kouba, A., & Velisek, J. (2019). Effects of S-metolachlor and its degradation product metolachlor OA on marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). *Chemosphere*, 224, 616-625. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.02.187.
- Tolbert, P. E., Shy, C. M., & Allen, J. W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271(1), 69-77. DOI: 10.1016/0165-1161(92)90033-I.
- Unrine, J. M., Hopkins, W. A., Romanek, C. S., & Jackson, B. P. (2007). Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: implications for amphibian health and contaminant transport. *Environmental Pollution*, 149(2), 182-192. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.01.039
- USEPA. 1975. USEPA 660/375-009. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians. United States Environmental Protection Agency. Manual. Washington, D.C., EUA.
- Vallotton, N., Moser, D., Eggen, R. I., Junghans, M., & Chèvre, N. (2008). S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere*, 73(3), 395-400. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.05.039.
- Van Opstal, N. V., Gabioud, E. A., Seehaus, M. S., Pighini, R. J., Repetti, M. R., Wilson, M. G., ... & Sasal, M. C. (2023). Spatial distribution of pesticides in surface water of the Estacas stream (Argentine Espinal region) associated with crop production. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(15), 43573-43585. DOI: 10.1007/s11356-023-25373-2.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Kubec, J., Buric, M., & Kouba, A. (2019). Effects of s-metolachlor on early life stages of marbled crayfish. *Pesticide biochemistry and physiology*, 153, 87-94. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.11.007.
- Vera-Candioti, J., Araujo, P. I., Huerga, I. R., Rojas, D. E., Cristos, D. S., & Malmantile, A. D. (2021). Pesticides detected in surface and groundwater from agroecosystems in the Pampas region of Argentina: occurrence and ecological risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193, 1-20. DOI: 10.1007/s10661-021-09462-8.

- Wan, M. T., Buday, C., Schroeder, G., Kuo, J., & Pasternak, J. (2006). Toxicity to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus tshawytscha*, and *Rana catesbeiana* of atrazine, metolachlor, simazine, and their formulated products. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 76(1), 52-58. DOI: 10.1007/s00128-005-0888-4.
- Wells, K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press.
- Williams, B. K., & Semlitsch, R. D. (2010). Larval responses of three Midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 819-827. DOI: 10.1007/s00244-009-9390-z.
- Zhelev, Z., Tsonev, S., Georgieva, K., & Arnaudova, D. (2018). Health status of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in Southern Bulgaria and its importance in assessing environmental state: haematological parameters. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 7884-7895. DOI: 10.1007/s11356-017-1109-5
- Zhu, X. W., & Chen, J. Y. (2016). mixtox: An R Package for Mixture Toxicity Assessment. *R J.*, 8(2), 421.

CAPÍTULO 4. Efectos subletales provocados por una formulación comercial de S-metolaclo-ro sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae), a diferentes niveles de organización.

INTRODUCCIÓN

Las prácticas agrícolas contribuyen a la contaminación y degradación de los ambientes acuáticos, ya que a menudo los plaguicidas utilizados y sus principales metabolitos son detectados en cuerpos de agua superficiales (ej. Gilliom *et al.*, 2006; De Liguoro *et al.*, 2014; Nardo *et al.*, 2015), a los cuales llegan principalmente por escorrentía (Krutz *et al.*, 2005; Martino *et al.*, 2008). En consecuencia, los organismos acuáticos no objetivo están expuestos a un ambiente en condiciones de estrés. Las larvas de anuros son particularmente vulnerables frente a estas condiciones, a causa de su piel altamente permeable (Wells, 2007); motivo por el cual son considerados buenos bioindicadores ambientales (Hopkins, 2007). Tradicionalmente la evaluación de la calidad de los ambientes acuáticos está basada en la determinación de los parámetros fisicoquímicos del agua, lo cual permite evaluar los niveles de contaminantes, pero no sus efectos (Lajmanovich & Peltzer, 2008). Por este motivo es importante complementar estas técnicas con el uso de biomarcadores que permiten detectar la presencia de los contaminantes y sus consecuencias biológicas; así como medir efectos subletales (Livingstone, 1993).

Los biomarcadores son las diversas respuestas biológicas o cambios que pueden medirse a distintos niveles (ej. bioquímico, fisiológico, morfológico, histológico) en sistemas biológicos en respuesta a xenobióticos o estresores ambientales (Gupta, 2014). Existen distintos tipos de biomarcadores en función del nivel de organización del parámetro a estudiar. Dentro de los biomarcadores más utilizados para evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de diversos agroquímicos en anfibios, se destacan la presencia de micronúcleos (MN); y también otras aberraciones nucleares en los eritrocitos (ANE) (Peltzer *et al.*, 2013; Lajmanovich *et al.*, 2013; 2014; 2017; 2018; Nikoloff *et al.*, 2014; Pérez-Iglesias *et al.*, 2014; 2015; 2016; Ruiz de Arcaute *et al.*, 2014; Babini *et al.*, 2016; Pollo *et al.*, 2017; 2019). Estos biomarcadores, reflejan daños en etapas iniciales de exposición y son señales de alerta temprana frente a impactos ambientales (Josende *et al.*, 2015). Por otra parte, el uso de biomarcadores morfológicos en larvas de anuros (como las relaciones longitud/masa corporal o tasa de crecimiento/desarrollo, así como la presencia de anormalidades morfológicas) han resultado útiles para determinar los efectos de los agroquímicos a nivel individual (Peltzer *et al.*, 2013; Pérez-Iglesias *et al.*, 2015; 2019; Babini *et al.*, 2016; Natale *et al.*, 2018; Curi *et al.*, 2019; Barreto *et al.*, 2020). Sin embargo, es importante destacar que para lograr un análisis más robusto, fiable e integrado sobre la acción de los contaminantes, es recomendable la utilización de varios tipos de biomarcadores (Pollo *et al.*, 2015; Lajmanovich *et al.*, 2021).

El S-metolaclo (SM) (CAS 87392-12-9), pertenece al grupo de las cloroacetamidas, y junto con el Glifosato y la Atrazina, es uno de los herbicidas más utilizados en el mundo (Atwood & Paisley-Jones, 2017). Es de carácter selectivo y se utiliza para el control de gramíneas y malezas de hoja ancha en varios tipos de cultivos

como el maíz, la soja, árboles frutales, etc. (Lewis *et al.*, 2016). Presenta un alto potencial de bioacumulación, mientras que su movilidad ambiental, solubilidad en agua y persistencia en suelo es moderada (Lewis *et al.*, 2016; Observatorio Ambiental Nacional, 2022). Por estas propiedades se ve favorecida su escorrentía agrícola hacia las aguas superficiales que contamina (Zemolin *et al.*, 2014); y por su alto potencial de lixiviación también contamina las aguas subterráneas, donde puede tardar hasta 1000 días en degradarse (PAN Pesticide Database, 2022; Manual de Plaguicidas de Centroamérica, 2022). En suelo se degrada por acción microbiana a dos metabolitos principales, los ácidos metolacloretanosulfónico y metolacloroxanílico (Zemolin *et al.*, 2014). Sidoli *et al.* (2016) plantean que estos metabolitos son móviles y persistentes en el ambiente. Según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GSH), desarrollado por las Naciones Unidas, el SM es un herbicida muy tóxico para los organismos acuáticos con efectos nocivos duraderos, representando un peligro a corto y a largo plazo en este medio (National Center for Biotechnology Information, 2022).

Los trabajos disponibles acerca del efecto tóxico del SM y sus formulados comerciales (FC) sobre las primeras etapas de vida de los anfibios anuros son escasos. Se han reportado los efectos subletales crónicos del ingrediente activo (i.a.) SM sobre embriones de *Pelophylax perezi* (Quintaneiro *et al.*, 2018). También se han evaluado los efectos subletales crónicos del herbicida Dual II Magnum (83,7% SM) sobre larvas de *Anaxyrus americanus*, *Pseudacris triseriata* y *Dryophytes versicolor* (Williams *et al.*, 2010). Considerando que los herbicidas suelen aplicarse en el campo en FC y que los anfibios pueden estar expuestos durante todo su desarrollo embrionario y larval a bajas concentraciones de los mismos; se necesitan más estudios que evalúen los efectos crónicos de formulaciones de herbicidas a concentraciones subletales, por tratarse de condiciones más similares a las naturales.

El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos subletales a nivel de organización individual y celular, del herbicida Dual Gold[®], a base de S-metolaclo, sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae), utilizando bioensayos de toxicidad crónicos (25 días de exposición). Las respuestas biológicas analizadas incluyeron supervivencia, crecimiento y desarrollo, y aparición de anomalías morfológicas; mientras que las respuestas a nivel celular incluyeron la formación de micronúcleos y de otras aberraciones nucleares en los eritrocitos.

Hipótesis:

El herbicida DG[®] afecta a las larvas de *Leptodactylus luctator* a nivel celular e individual.

Predicciones:

Se espera encontrar una mayor frecuencia de MN y de aberraciones nucleares en los eritrocitos de larvas expuestas al herbicida, en relación con las larvas del grupo control.

Las larvas expuestas al DG[®] presentaran una menor tasa de desarrollo y crecimiento en comparación con las larvas del control.

Se observará una mayor frecuencia de anomalías morfológicas en las larvas expuestas al herbicida, en relación con las larvas del grupo control.

MATERIALES Y MÉTODOS

La especie de prueba

Leptodactylus luctator (Anura: Leptodactylidae), posee una extensa distribución en el cono sur Sudamericano (Magalhaes *et al.*, 2020). Por su amplio uso de hábitat es común encontrarla en zonas de campo natural, así como en ambientes modificados por la actividad agrícola y forestal (Maneyro & Carreira, 2012). Se reproduce en cuerpos de agua lénticos permanentes o estacionales; y sus huevos son depositados en nidos de espuma. Tanto los huevos como las larvas (estas últimas, de comportamiento gregario) son protegidos por la hembra hasta el fin de la metamorfosis (Vaz-Ferreira & Gerhau, 1975). Se trata de una especie común, no amenazada a nivel local (Carreira & Maneyro, 2015), ni a nivel global (Heyer *et al.*, 2010).

Colecta y mantenimiento de larvas de *Leptodactylus luctator*

Las larvas de *L. luctator* en estadio GS 25 (Gosner, 1960), se colectaron manualmente, de un sitio sin actividad agrícola, en la zona de Melilla, Montevideo, Uruguay; y fueron trasladadas al laboratorio. La longitud corporal promedio de las larvas fue de 9.7 ± 0.7 (8.4-11.5) mm; y la masa fue de 0.13 ± 0.02 (0.09-0.18) g. Estas fueron aclimatadas durante 48 hs en acuarios con agua de grifo filtrada (filtro PSA, modelo senior 3), y declorada (pH=7,6 $\pm$ 0.4; conductividad =374 $\pm$ 22 μ Ss-1; oxígeno disuelto=8.4 $\pm$ 0.9 mgL-1; temperatura=19 $\pm$ 1.3°C); con aireación artificial constante. Se mantuvo un fotoperíodo de 12:12 horas luz/oscuridad; y una temperatura ambiente de 22 $\pm$ 2°C (Junges *et al.*, 2012; Lajmanovich *et al.*, 2014). Las larvas fueron alimentadas hasta el comienzo del bioensayo con lechuga hervida (*Lactuca sativa*) (Junges *et al.*, 2012; Lajmanovich *et al.*, 2014).

Diseño experimental

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los protocolos de experimentación aprobados por la Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (protocolos número 474 y 684). Se utilizó el formulado comercial Dual Gold[®] 960 EC (DG[®]) (87.3% S-metolaclo-ro ((S)-2-cloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-(2-metoxi-1-metiletil) acetamida,

CAS#87392-12-9), comercializado por Syngenta Uruguay S.A. A lo largo del estudio se hará referencia a las concentraciones nominales del ingrediente activo (i.a.) SM contenidas en DG[®]. Se realizaron experimentos crónicos de 25 días de duración (600 h) con el fin de determinar los efectos subletales del DG[®] sobre las larvas de *L. luctator* en estadio GS25 (Gosner, 1960), expuestas. Se testaron dos concentraciones subletales del herbicida correspondientes a la concentración sin efecto observado (NOEC=5.0 mg/L SM=T2) y NOEC/5 (1 mg/L SM=T1). El valor de NOEC del herbicida DG[®] para larvas de *L. luctator* (GS25), fue determinado en bioensayos de toxicidad agudos (ver capítulo 3 de esta Tesis). Se utilizó un control negativo (C) con agua de canilla filtrada y declorada. Se utilizaron frascos de vidrio de cinco litros de capacidad, con dos litros de solución de prueba cada uno. El recambio de las soluciones de ensayo fue cada 48 h, y en cada recambio se controlaron los parámetros de pH, OD (mg/l), conductividad y temperatura del agua (°C), siguiendo las recomendaciones de USEPA (1975). Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento (T1, T2 y C); y se colocaron 15 larvas por frasco/réplica (n=135 larvas). Las soluciones de prueba y el control se prepararon inmediatamente antes del comienzo del experimento, y de cada recambio.

A lo largo del bioensayo, las larvas fueron alimentadas con lechuga hervida cada 48 h. La mortalidad se registró cada 24 h; y se determinó por la ausencia de movimiento luego de tocar a las larvas con una varilla plástica, y por los cambios en su coloración y apariencia (Bach *et al.*, 2016). Los individuos muertos fueron removidos inmediatamente y fijados en formol al 10%.

Efectos subletales

Los efectos subletales se registraron luego de 25 días de exposición de las larvas de *L. luctator* a las dos concentraciones de DG[®] testadas. Estos efectos se evaluaron a nivel individual; mediante la medición de puntos finales relacionados con el desarrollo, crecimiento y presencia de anomalías morfológicas; así como a nivel celular, mediante el análisis de eritrocitos de sangre periférica de las larvas expuestas.

Nivel individual

Crecimiento y desarrollo

El primer día del experimento, antes de colocar a las larvas en sus respectivos tratamientos, se determinó la masa (M) húmeda en g, de cuatro larvas al azar para cada réplica (12 en total por tratamiento), utilizando una balanza digital Radwag WTB 2000, de 0.01 g de precisión. Esas larvas fueron fotografiadas para posteriores medidas morfológicas, se determinó su estadio de desarrollo, y se colocaron junto a otras larvas (también seleccionadas al azar) en cada una de las réplicas de cada tratamiento (n=15 larvas por frasco). Al final del experimento (día 25), se volvieron a seleccionar cuatro larvas al azar por réplica del control y de T1, y las larvas sobrevivientes de T2. Estas

fueron pesadas vivas (masa húmeda); fotografiadas y luego se sacrificaron siguiendo los protocolos experimentales aprobados por la CEUA (protocolos número 474 y 684). A través de las fotografías, utilizando el software Micrometrics ® SE Premium; se determinaron las siguientes variables morfológicas: longitud del cuerpo (BL); longitud de la aleta caudal (TFL); alto del cuerpo (BD); altura del músculo de la cola (TMD); altura máxima de la aleta caudal (TFD); ancho máximo del músculo de la cola (TW) y ancho máximo del cuerpo (BW) (Relyea & Werner, 2000; Teplitsky *et al.*, 2003) (Figura 1). La longitud total del cuerpo desde la punta del hocico a la punta de la cola (TL) se calculó como la suma de BL+TFL. El estadio de desarrollo de las larvas se registró bajo una lupa estereoscópica binocular Nikon SM800 siguiendo los criterios de Gosner (1960).

Las tasas de crecimiento (GR) y de desarrollo (DR) de las larvas, se calcularon de la siguiente manera: $GR = \exp(\ln(\text{masa final}/\text{masa inicial}) / \text{número de días del experimento})$; $DR = \text{etapa final} - \text{etapa inicial} / \text{número de días del experimento}$ (Teplitsky *et al.*, 2003).

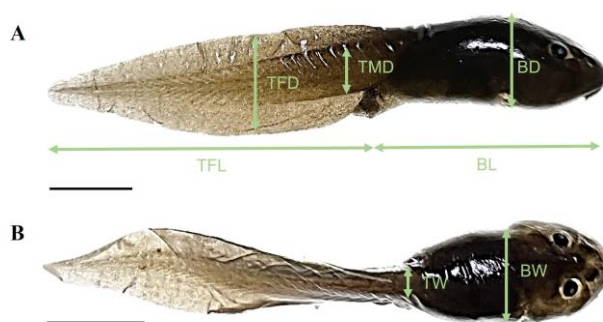


Figura 1. Variables morfológicas medidas en larvas de *Leptodactylus luctator*. A. Vista lateral. TFL: longitud de la aleta caudal (mm); BL: Longitud del cuerpo (mm); TFD: altura máxima de la aleta caudal; TMD: altura del músculo de la cola; BD: Alto del cuerpo. B. Vista dorsal. BW: ancho máximo del cuerpo y TW: ancho máximo del músculo de la cola. La barra negra representa una escala de 5 mm.

Anormalidades morfológicas

Una vez finalizado el bioensayo, los individuos sobrevivientes fueron sacrificados (siguiendo los protocolos 474 y 684), fijados, y analizados en búsqueda de anomalías morfológicas externas. También se analizaron las larvas preservadas que murieron durante el transcurso del experimento. Estas anomalías fueron registradas bajo una lupa estereoscópica binocular Nikon SM800; se fotografiaron utilizando una cámara digital 319 CU (3.2M) CMOS Microscopy Camera, y se clasificaron siguiendo criterios estandarizados (Krishnamurthy & Smith, 2011; Peltzer *et al.*, 2013; Curi *et al.*, 2017; Sansiñena *et al.*, 2018). Se destacan cuatro categorías de anomalías: 1. las anomalías en la cola (ej. flexión de la cola; cola rígida); 2. las anomalías intestinales (ej. intestino

desviado; desenrollamiento del intestino); 3. las anomalías en la forma del cuerpo (ej. cuerpo hinchado, cuerpo con forma de diamante; ejes corporales curvos); y 4. las anomalías en el disco oral (ej. pérdida de queratodontes). La prevalencia de un tipo particular de anomalía se calculó dividiendo el número de larvas que la presenta sobre el número de individuos examinados (Peltzer *et al.*, 2013).

Nivel celular

Ensayo de Micronúcleos (MN)

El tratamiento T2 no fue considerado para los análisis de genotoxicidad, debido a la alta mortalidad de larvas registrada. Las larvas sobrevivientes de T2, fueron incluidas en los análisis de puntos finales de crecimiento y desarrollo; y de anormalidades morfológicas.

La genotoxicidad del herbicida se determinó utilizando el Test de MN (Schmidt, 1975). Los MN son cuerpos citoplasmáticos, que se asemejan al núcleo principal, originados a partir de cromosomas o fragmentos de cromosomas que durante la metafase mitótica no se integran al núcleo, lo cual puede ocurrir espontáneamente o por la acción de genotóxicos (Lajmanovich *et al.*, 2012). Para la correcta identificación de los MN, nos basamos en los criterios abordados por Fenech, 2000 y Meintières *et al.*, 2001. Al final del experimento, se extrajo sangre de 4 larvas al azar por réplica del tratamiento T1 (1 mg/L SM), y del Control (n=12 larvas por tratamiento), y se prepararon frotis por duplicado sobre portaobjetos limpios. Las larvas fueron sacrificadas siguiendo los protocolos antes citados. Los frotis se fijaron utilizando alcohol absoluto y fueron teñidos mediante la técnica May-Grünwald Giemsa (MGG) (Barni *et al.*, 2007; Lajmanovich *et al.*, 2014). Se determinó la frecuencia de MN en 1000 eritrocitos por cada larva, usando un microscopio óptico Olympus BX41, con una magnificación de 1000x (Lajmanovich *et al.*, 2005; 2014). Los portaobjetos codificados y aleatorizados fueron puntuados a ciegas por un único observador. Los frotis fueron fotografiados con una cámara Evolution vf cooled color, y las imágenes se procesaron con el Software ImageJ (National Institute of Health, USA).

Aberraciones nucleares de los eritrocitos (ENA)

La frecuencia de ENA se determinó en 1000 eritrocitos por larva, utilizando los mismos portaobjetos que se usaron para el test de MN, y la misma técnica de análisis. Las ENA se clasificaron siguiendo los criterios de Carrasco, 1990; Guilherme *et al.*, 2008; Lajmanovich *et al.*, 2014; 2015; y Josende *et al.*, 2015. Se determinaron las frecuencias de células binucleadas (BE); núcleos lobados (LN); núcleos en forma de riñón (K); núcleos con muescas (NN); núcleos ampollados (BbN); núcleos con brotes (BN); y de eritoplástidos o eritrocitos anucleados (EP). Cuando la muesca en el núcleo fue más pronunciada, definimos a esa aberración como núcleos en forma de herradura

(HN). La frecuencia de ANE se expresó como el valor medio (‰) de la suma de todos los tipos de aberraciones individuales observadas (Lajmanovich *et al.*, 2014).

Las frecuencias de MN y de ENA en larvas expuestas a 1 mg/L SM durante 25 días, se evaluaron y compararon con el control negativo; y con la frecuencia de MN y ENA a la misma concentración de ensayo, pero a las 48 y 96 hrs de exposición (ver capítulo 3), con el fin de evaluar el efecto del tiempo de exposición sobre estos biomarcadores.

Análisis de datos

Para probar la normalidad de los datos, y la homogeneidad de varianzas, se utilizó el test de Shapiro-Wilk (SW), y el test de Levene, respectivamente (Zar, 2010). Se analizaron las diferencias en la M (g) y TL (mm) de las larvas entre los distintos tratamientos, al comienzo y al final del experimento. Para las variables que cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se aplicó un análisis de varianza paramétrico (ANVA) y en caso de encontrarse diferencias significativas, el test post hoc de Tukey (Zar, 2010). Si las variables no cumplieron con los supuestos paramétricos, se aplicó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y en caso de encontrarse diferencias significativas, el test de Mann-Whitney, corregido por el criterio de Bonferroni (Zar, 2010).

Se calculó el cociente entre las distintas variables morfológicas (BW, TW, TFD, TFL, TMD y BD) y la longitud del cuerpo (BL) de las larvas, con el fin de minimizar el efecto del tamaño en estas medidas; y luego se aplicó un análisis de componentes principales (PCA), para determinar cuáles de las variables morfológicas aportan más a la variabilidad de los efectos. La variación en TFD, GR, y DR de las larvas entre los tratamientos, se evaluó utilizando el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y en caso de encontrar diferencias significativas se utilizó el test de Mann-Whitney corregido por el criterio de Bonferroni (Zar, 2010). Por otra parte, las diferencias en la proporción total de anomalías morfológicas entre cada tratamiento con DG[®] y el control se analizaron mediante el test de proporción binomial (Margolin *et al.*, 1983).

Las frecuencias de MN y de ANE se determinaron a los 25 días de exposición; y se expresaron como la media $\pm$ el error estándar. Los datos de MN y ANE se analizaron utilizando el test de proporción binomial (Margolin *et al.*, 1983). Para comprobar si existen diferencias en las respuestas genotóxicas a la misma concentración del herbicida (1 mg/L) en función del tiempo de exposición de las larvas, se compararon las frecuencias de MN y ENA entre las 48 y 600 h de exposición; y entre las 96 y 600 h de exposición, utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney (Zar, 2010). Los análisis estadísticos fueron realizados con el Software PAST (Paleontological STatistics)

versión 2.17c (Hammer *et al.*, 2001); y BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007). En todos los casos se utilizó un nivel de significancia de $\alpha=0.05$

RESULTADOS

No se registró mortalidad en el control negativo a lo largo del ensayo. A la concentración más baja testada (T1=1 mg/L SM) se registró una mortalidad del 13,3%; mientras que en la concentración T2=5 mg/L de SM, la mortalidad fue del 75,6%.

Efectos subletales

Crecimiento y desarrollo

En la tabla 1 se presentan los datos promedio de Masa (g) y de las medidas morfológicas (mm) de las larvas para cada tratamiento (Control, T1 y T2), al comienzo (día 1) y al final del experimento (día 25). No se encontraron diferencias significativas en la M (g) ($F=0.20_{(2,33)}$; $p=0.82 >0.05$), ni en el largo total (TL mm) ($F=0.98$; $p=0.38 >0.05$) de las larvas entre los tratamientos al comienzo del experimento. En cambio, al final del experimento (día 25) se encontraron diferencias significativas en la M (g) ($F=64.24_{(2,32)}$; $p=6.25e-12 <0.05$); y en TL (mm) ($H=18.79$; $p=8.24e-05 <0.05$) de las larvas entre los tratamientos. Las larvas del control negativo fueron significativamente más pesadas que las de T1 ($p=0.0001 <0.05$) y T2 ($p=0.0001 <0.05$). Por otra parte, las larvas del control negativo y de T2 presentaron una mayor longitud que las larvas de T1 ($p=8.577e-05 <0.05$ y $p=0.003 <0.05$; respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en TL (mm) entre las larvas del control negativo y T2 ($p=0.08 >0.05$). El análisis de componentes principales (ACP) mostró que el componente 1 y el 2 explicaron el 92,2% de la variabilidad total. Para el componente 1 la variable que más aportó fue TFL (0.94); mientras que para el componente 2, las variables que más aportaron fueron TFD (0.64) y BW (0.49) (Tabla 2). Se encontraron diferencias significativas en TFD (mm) de las larvas entre los tratamientos ($H=13.71$; $p=0.001 <0.05$). Las larvas del control negativo presentaron una mayor altura máxima de la aleta caudal en relación con las larvas de T1 y T2 ($p=0.001 <0.05$; y $p=0.01 <0.05$, respectivamente). La tasa de crecimiento de las larvas también presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($H=21.35$; $p=2.29e-05 <0.05$), siendo significativamente mayor en el grupo control en relación con T1 ($p=0.0002 <0.05$) y T2 ($p=0.0004 <0.05$). Finalmente, se encontraron diferencias significativas en DR de las larvas entre tratamientos ($H=17.6$; $p=9.42e-05 <0.05$). Las larvas del control presentaron un mayor desarrollo que las larvas de T1 ($p=0.0002 <0.05$) y T2 ($p=0.04 <0.05$).

Tabla 1. Datos de medidas corporales de larvas de *Leptodactylus luctator* al comienzo del experimento (día 1); y luego de 25 días de exposición al DG[®]. Referencias: M: masa (g); TL: longitud total (mm); BW: ancho máximo del cuerpo (mm); TW: ancho máximo del músculo de la cola (mm); BD: alto del cuerpo (mm); TMD: altura del músculo de la cola (mm); TFD: altura máxima de la aleta caudal (mm); SD: Desvío estándar; Control= 0 mg/L SM; T1=1 mg/L SM; T2=5 mg/L SM.

Medidas larvas	Día experimental	Tratamiento		
		Control	T1	T2
M ± SD (Mín-Máx) g	1	0.13 ±0.02 (0.10-0.17)	0.13±0.03 (0.09-0.16)	0.14±0.02 (0.11-0.18)
TL ± SD (Mín-Máx) mm		22.2 ±1.86 (19.8-25.3)	23.2 ±2.19 (20.5-27.1)	22.5 ±1.34 (20.4-24.2)
BW ± SD (Mín-Máx) mm		4.7 ±0.4 (4.3-5.4)	4.8 ±0.3 (4.3-5.4)	4.7 ±0.4 (4-5.2.0)
TW ± SD (Mín-Máx) mm		1.8 ±0.3 (1.2-2.1)	1.7 ±0.2 (1.4-2.0)	1.6 ±0.2 (1.3-1.9)
BD ± SD (Mín-Máx) mm		4.2 ±0.4 (3.6-5.0)	4.1 ±0.2 (3.7-4.6)	4.2 ±0.3 (3.8-4.6)
TMD ± SD (Mín-Máx) mm		2.1 ±0.4 (1.3-2.6)	2.1 ±0.4 (1.5-3.0)	1.9 ±0.2 (1.5-2.3)
TFD ± SD (Mín-Máx) mm		4.1 ±0.5 (3.3-4.9)	4.2 ±0.4 (3.4-4.9)	4.0 ±0.3 (3.3-4.5)
M ± SD (Mín-Máx) g	25	0.23 ±0.02 (0.20-0.29)	0.11±0.03 (0.05-0.18)	0.16±0.02 (0.14-0.2)
TL ± SD (Mín-Máx) mm		31.5 ±1.5 (29.4-34)	26.1 ±2.9 (19.6-29.7)	30.1 ±2.4 (25.5-34.7)
BW ± SD (Mín-Máx) mm		5.8 ±0.5 (5.0-6.8)	4.7 ±0.4 (4.0-5.7)	5.5 ±0.6 (4.5-6.3)
TW ± SD (Mín-Máx) mm		2.1 ±0.1 (2.0-2.4)	1.8 ±0.2 (1.4-2.2)	1.9 ±0.2 (1.5-2.2)
BD ± SD (Mín-Máx) mm		5.1 ±0.4 (4.6-5.9)	4.2 ±0.5 (3.2-5.2)	4.8 ±0.5 (4.2-5.7)
TMD ± SD (Mín-Máx) mm		2.4±0.2 (2.1-2.9)	2.1 ±0.3 (1.7-2.6)	2.1 ±0.4 (1.6-3.2)
TFD ± SD (Mín-Máx) mm		5.2 ±0.4 (4.5-5.9)	4.1 ±0.6 (3.6-5.3)	4.4 ±0.6 (3.6-5.4)

Tabla 2. Resultados del Análisis de Componentes Principales y contribución de cada variable a los factores 1 y 2. Referencias: BW: ancho máximo del cuerpo (mm); TW: ancho máximo del músculo de la cola (mm); BD: alto del cuerpo (mm); TMD: altura del músculo de la cola (mm); TFD: altura máxima de la aleta caudal (mm); TFL: longitud de la aleta caudal.

Variables morfológicas	Componentes principales	
	1	2
BW	0.17	0.49
TW	0.06	0.14
TFD	0.21	0.64
TMD	0.14	0.3
BD	0.12	0.36
TFL	0.94	-0.33

Anormalidades morfológicas

Se observaron siete tipos de anomalías morfológicas en larvas de *L. luctator* expuestas a DG[®]: cuerpo cóncavo (CB); cuerpo hinchado (SB); cuerpo en forma de diamante (DSB); intestino desviado (DG); flexión de la cola (TF); cola curva o rígida (ST); pérdida de queratodontes (KL) (Figura 2). La frecuencia de anomalías

morfológicas detectadas en las larvas analizadas del grupo control fue de 6,7%; mientras que en el tratamiento T1 fue de 51,7%, y en T2 fue de 62,5%. La comparación estadística entre los tratamientos mostró que la proporción total de anomalías morfológicas era significativamente mayor en T1 y T2 en relación con el control ($Z_{C/T1}=-3.82$; $p<0.0001$; $Z_{C/T2}=-4.75$; $p<0.0001$). En la tabla 3 se resumen los valores de prevalencia de cada tipo de anomalía. La presencia de un cuerpo cóncavo ventralmente fue la anomalía más frecuente en las larvas expuestas a DG[®] durante 25 días (Tabla 3). Cabe destacar, que registramos individuos expuestos al herbicida, con más de una malformación morfológica (Ej. DSB+KL).

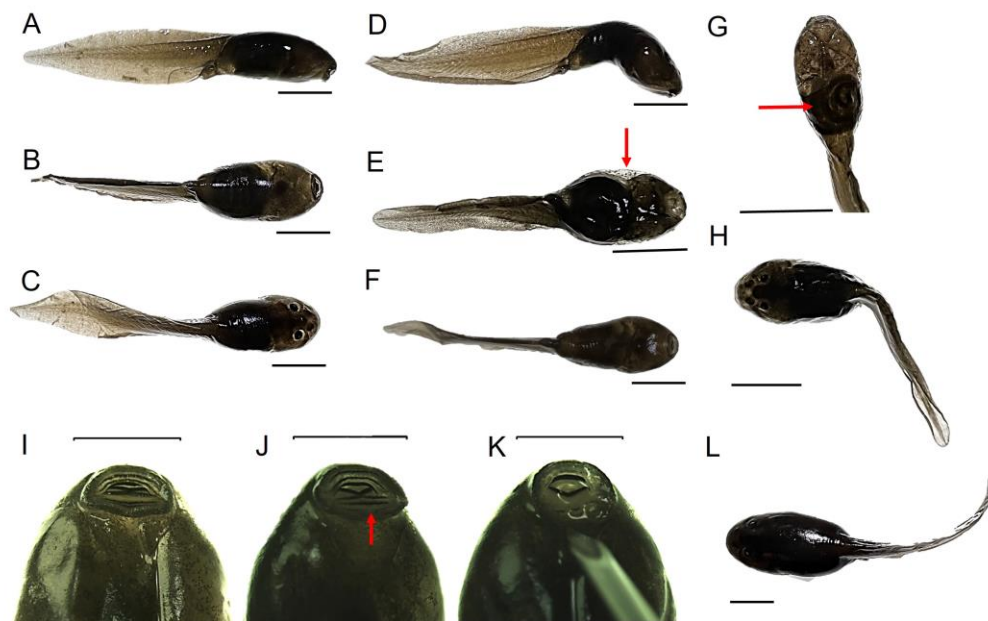


Figura 2. Anormalidades morfológicas detectadas en larvas de *L. luctator*. Referencias: A; B y C: Larva normal sin anormalidades morfológicas del control (0 mg/L SM): vistas lateral, ventral y dorsal; D: Cuerpo cóncavo (CB); E: Cuerpo hinchado (SB); F: Cuerpo en forma de diamante (DSB); G: Intestino desplazado lateralmente (DG); H: Flexión de la cola (TF); I: Disco oral sin alteraciones; J y K: Pérdida de queratodontes (KL); L: Cola rígida (ST). Figuras A-H y L; las barras negras representan una escala de 5 mm. Figuras I-K; las barras negras representan una escala de 10 mm.

Tabla 3. Prevalencia de anormalidades en larvas de *Leptodactylus luctator* expuestas a DG[®] y al control. Referencias: KL: Pérdida de queratodontes; DG: Intestino desplazado lateralmente; CB: Cuerpo cóncavo; SB: Cuerpo hinchado; DSB: Cuerpo en forma de diamante; ST: Cola rígida; TF: Flexión de la cola; Control= 0 mg/L SM; T1=1 mg/L SM; T2=5 mg/L SM. *** $p<0.001$: diferencias significativas con respecto al control (Test de proporción binomial).

Tratamiento	Anormalidades morfológicas							
	KL	DG	CB	SB	DSB	ST	TF	Total
Control	0.03	0	0.03	0	0	0	0	0.07
T1	0.17	0.03	0.24	0.03	0	0.03	0	0.52***
T2	0.08	0.05	0.25	0.05	0.10	0.05	0.05	0.63***

MN y ENA

Los eritrocitos maduros de las larvas de *L. luctator* tenían forma ovalada, con un núcleo bien definido y de posición central (Figura 3A). Los MN se reconocieron fácilmente en el citoplasma celular, ya que estaban separados del núcleo principal y tenían un tamaño menor (Figura 3F). Además de los micronúcleos se identificaron distintos tipos de ENA (Figura 3 B-E, G-N). También se observaron células en proceso de mitosis (Figura 3O). Las frecuencias de MN y de ENA en larvas expuestas al herbicida durante 25 días (600 h) fueron significativamente mayores que en el grupo de control negativo (Tabla 4). Notamos que las frecuencias (%) de ENA fueron más altas que las de MN (Tabla 4).

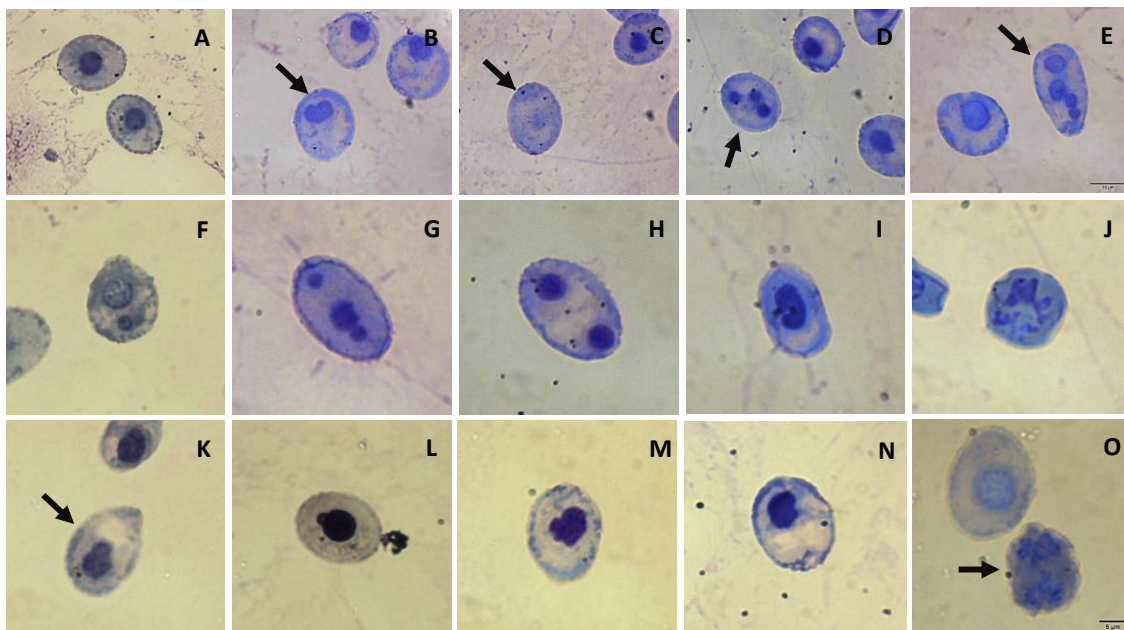


Figura 3. Detalle de eritrocitos observados en larvas de *Leptodactylus luctator* expuestas al herbicida DG®, a base de S-metolaclo. (A) eritrocitos normales; (B) núcleo en forma de riñón (K); (C) eritoplástido o eritrocito anucleado (EP); (D) célula multinucleada (tres núcleos); (E) célula multinucleada (cuatro núcleos); (F) Micronúcleo (MN); (G) célula con dos micronúcleos; (H) célula binucleada (BE); (I) núcleo en forma de herradura (HN); (J) célula apoptótica (AP); (K) núcleo lobado (LN); (L) núcleo con brote (BN); (M) núcleo ampollado (BbN); (N) núcleo con muesca (NN); (O) eritrocito en mitosis (M). May Grünwald-Giemsa, 100x. La barra negra en la imagen E representa una escala de 10 μ m (imágenes A-E). La barra negra en la imagen O representa una escala de 5 μ m (imágenes F-O).

Tabla 4. Frecuencias (%) de MN y ENA en larvas de *L. luctator* expuestas al herbicida DG® a base de S-metolaclo-ro durante 600 h (media $\pm$ SE). Control (0 mg/L SM); T1=1 mg/L SM. *** p <0.001: diferencias significativas con respecto al control (Test de proporción binomial).

Anomalia nuclear	Tratamiento	
	Control	T1
MN	0.69 $\pm$ 0.01	3.24 $\pm$ 0.03***
ENA	7.16 $\pm$ 0.07	24.61 $\pm$ 0.23***

En las larvas del tratamiento T1, predominaron las aberraciones del tipo BE y NN (Figura 4). Cabe destacar que las células con dos MN (Fig. 5G), las células multinucleadas (Figura 3D y E), y las células binucleadas con uno y dos MN, solo se observaron en larvas expuestas al herbicida (Figura 4). Por otra parte, las frecuencias de MN y de ENA en larvas expuestas a 1 mg/L de DG® durante 25 días, fueron significativamente mayores que las reportadas para larvas de la especie expuestas a la misma concentración del herbicida a las 48 (MN: $U=2.5$; $p=4.042e-05$ <0.05; ENA: $U=0$; $p=3.395e-05$ <0.05) y 96 (MN: $U=9.5$; $p=0.0002$ <0.05; ENA: $U=0$; $p=3.395e-05$ <0.05) h de exposición. Los datos de frecuencia (%) de MN y de ENA a las 48, 96 y 600 h de exposición de las larvas se muestran en la tabla 5.

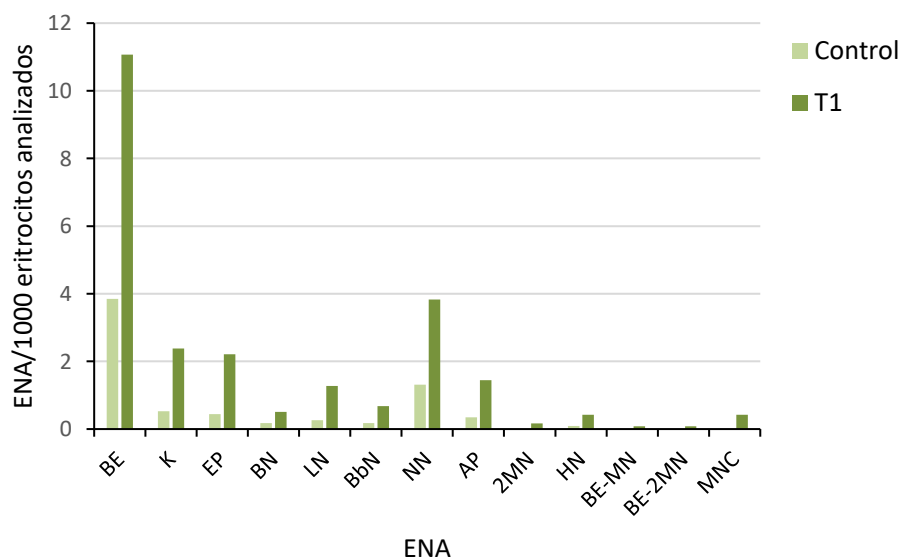


Figura 4. Frecuencia (%) de distintos tipos de aberraciones nucleares en eritrocitos (ANE) de larvas de *L. luctator* expuestas al herbicida DG® a base de S-metolaclo-ro durante 600 h. Control (0 mg/L SM); T1=1 mg/L SM; BE: célula binucleada; K: núcleos en forma de riñón; EP: eritroplástidos o eritrocitos anucleados; BN: núcleos con brotes; LN: núcleos lobados; BbN: núcleos ampollados; NN: núcleos con muescas; AP: célula apoptótica; 2MN: célula con 2 MN; HN: núcleo en forma de herradura; BE-MN: célula binucleada con un micronúcleo; BE-2MN: célula binucleada con 2 MN; MNC: célula multinucleada.

Tabla 5. Frecuencias (%) de MN y ENA en larvas de *L. luctator* expuestas a 1 mg/L del herbicida DG®, a base de S-metolaclo, durante 48, 96 y 600 h (media $\pm$ SE).

Anomalía nuclear	Tiempo de exposición (h)		
	48	96	600
MN	0.44 $\pm$ 0.004	0.62 $\pm$ 0.006	3.24 $\pm$ 0.03
ENA	6.03 $\pm$ 0.06	3.69 $\pm$ 0.03	24.6 $\pm$ 0.23

DISCUSIÓN

Trabajos previos han comprobado la sensibilidad de *L. luctator* en estudios ecotoxicológicos (Araujo *et al.*, 2014; Lajmanovich *et al.*, 2015; Bach *et al.*, 2016; Bach *et al.*, 2018; Paván *et al.*, 2021; Samojeden *et al.*, 2022), convirtiéndola en un buen modelo biológico para evaluar el potencial riesgo de los contaminantes ambientales. En este estudio se evaluaron los efectos subletales a nivel individual y celular del herbicida DG® a base de SM, sobre larvas de *Leptodactylus luctator* expuestas de forma crónica en condiciones de laboratorio. Se ha reportado la alteración de varios índices, así como lesiones hepáticas en individuos adultos de *Pelophylax ridibundus*, expuestos de forma crónica al formulado comercial DG® (Paunescu *et al.*, 2018). No obstante, este sería el primer estudio donde se evalúan los efectos crónicos a distintos niveles de organización de este formulado a base de SM, sobre larvas de anuros.

Efectos subletales

Crecimiento y desarrollo

El herbicida DG® afectó el crecimiento y desarrollo en larvas de *L. luctator* expuestas durante 25 días. Las larvas del control fueron más pesadas que las de T1 y T2, y exhibieron mayor TL (mm) que las de T1. Esto podría deberse a una alimentación menos activa y eficiente de las larvas en los tratamientos con DG®; como ya fue reportado previamente para larvas de anuros expuestas a xenobióticos (Rowe *et al.*, 1996; Krishnamurthy & Smith, 2011). Además, las larvas provenientes del tratamiento control presentaron mayor GR y DR que las larvas expuestas a DG®. Contrario a lo esperado, no se observaron diferencias en TL; entre larvas del grupo control y T2 (5 mg/L SM). Una posible explicación para este resultado es que en T2 se registró una alta mortalidad de larvas (75,6%), y probablemente, los individuos sobrevivientes fueron los de mayor tamaño. Esta alta mortalidad de individuos en T2 fue inesperada; ya que las concentraciones de prueba se correspondían a concentraciones subletales previamente determinadas en bioensayos agudos. Por lo tanto, se puede inferir que la toxicidad del DG® sobre larvas de *L. luctator*, incrementa en función del tiempo de exposición. Un resultado similar fue observado en larvas de *Physalaemus albonotatus*, expuestas de forma crónica a concentraciones subletales del herbicida a base de ácido 2,4

diclorofenoxiacético Amina Zamba® (Curi *et al.*, 2019). En relación con otras variables morfológicas, los resultados muestran que TFL y TFD (mm); son variables muy importantes que también se ven afectadas en larvas expuestas al DG®. Estas variables influyen en la capacidad de nado de las larvas de anuros (Altig & McDiarmid, 1999). Estudios previos han demostrado que las larvas con colas más grandes tienen un mejor rendimiento de natación y son más veloces, lo cual las ayuda a escapar rápidamente de los depredadores (Van Buskirk & McCollum, 2000; Teplitsky *et al.*, 2005). En consecuencia, las larvas de *L. luctator* expuestas al SM, con colas de menor longitud y altura, pueden ver afectado su desempeño natatorio, y ser más vulnerables frente a los depredadores en su hábitat natural.

Los resultados del presente estudio concuerdan con reportes previos acerca de los efectos crónicos del herbicida SM a nivel del desarrollo y crecimiento de organismos expuestos. Por ejemplo, retrasos en el desarrollo y un crecimiento más lento fueron observados en individuos del cangrejo jaspeado de río (*Procambarus virginalis*) expuestos de forma crónica al herbicida SM (Velisek *et al.*, 2019). En anuros, se observaron alteraciones en el desarrollo embrionario normal y una menor longitud en larvas de *Pelophylax perezi*; expuestas de forma crónica al herbicida SM (Quintaneiro *et al.*, 2018); y también retrasos en el crecimiento y desarrollo en larvas de *Rana pipiens* expuestas de forma crónica a una mezcla de atrazina+S-metolacoloro; y al herbicida Bicep II Magnum® (33% atrazina; 26,1% SM) (Hayes *et al.*, 2006). También se constataron retrasos en el crecimiento y/o desarrollo en larvas de anuros durante exposiciones crónicas a otros herbicidas (Howe *et al.*, 2004); funguicidas (Zhang *et al.*, 2019); y también a fluoruros (Chai *et al.*, 2016). El tamaño corporal de las larvas se relaciona con la supervivencia, siendo las más pequeñas más vulnerables a la depredación (Semlitsch & Gibbons, 1988); además, un retraso y un tamaño corporal pequeño en la metamorfosis pueden afectar el crecimiento y la tasa de supervivencia a futuro (Altwegg & Reyer, 2003); y también el éxito reproductivo de los individuos (Smith, 1987); efecto que se puede reconocer a nivel del tamaño poblacional muchos años después, cuando las larvas expuestas alcanzan la madurez sexual (Distel & Boone, 2011). Teniendo en cuenta estos aspectos y los efectos a nivel individual del DG® sobre larvas de *L. luctator*, podemos inferir que este herbicida representa un riesgo para los anfibios que habitan ambientes agrícolas.

Anormalidades morfológicas

La exposición crónica al herbicida DG® provocó la aparición de varias anomalías morfológicas en larvas de *L. luctator*. La capacidad de inducir anomalías morfológicas del SM se demostró previamente en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) (Quintaneiro *et al.*, 2016); y en larvas recién eclosionadas de la rana *Pelophylax perezi* (Quintaneiro *et al.*, 2018). Algunas de las malformaciones observadas en *P. perezi*

fueron curvatura y deformación de la columna; deformación de la cola; y microftalmia. En nuestro estudio, también observamos anomalías corporales y en la cola de las larvas expuestas al herbicida a base de SM. Las anomalías a nivel del cuerpo fueron las más frecuentes, concretamente se observaron cuerpos cóncavos ventralmente; cuerpos hinchados y cuerpos en forma de diamante. Estudios previos demostraron que larvas de anuros con cuerpos cóncavos, no se alimentaban normalmente (Sansiñena, 2020); y que las larvas con cuerpos hinchados presentaban una movilidad reducida (Sansiñena *et al.*, 2018). La presencia de cuerpos cóncavos fue recientemente observada en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a glifosato y glufosinato de amonio (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022). El cuerpo en forma de diamante solo se observó en larvas de *L. luctator* expuestas a 5 mg/L de DG[®]. Trabajos previos encontraron que las larvas con cuerpos en forma de diamante fueron más prevalentes en las concentraciones más altas de insecticidas y herbicidas testadas en bioensayos de exposición (Krishnamurthy & Smith, 2011; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019). Por lo tanto, esta anomalía corporal que se caracteriza por una superficie del cuerpo emaciado y un contorno de forma angular (Peltzer *et al.*, 2013), podría estar asociada con la exposición a concentraciones más altas de plaguicidas.

Luego de las anomalías corporales, encontramos una alta prevalencia de anomalías a nivel del disco oral de las larvas, específicamente la pérdida de queratodontes. En general, las larvas de anuros poseen en la boca un pico queratinizado, rodeado por el disco oral, una estructura flexible de márgenes típicamente papilados. En el disco oral, por encima y por debajo del pico se encuentran las filas transversales de queratodontes o dientes labiales (Wassersug & Yamashita, 2001). Durante la alimentación, los queratodontes se utilizan para anclar el disco oral al sustrato y también para raspar superficies generando una suspensión de partículas de alimento que son succionadas hacia la boca (Wassersug & Yamashita, 2001). Rowe *et al.*, 1996; observaron dificultades en la alimentación de larvas de *Aquarana catesbeiana* con ausencia de algunos queratodontes, en respuesta a la exposición a metales pesados. La eliminación de queratodontes en *Lithobates sphenoccephalus*, reduce la eficiencia de la alimentación, ya que las larvas no logran sujetarse bien a la superficie cubierta de algas, disminuyendo el tiempo de adhesión al sustrato, y en consecuencia, se incrementa la frecuencia de forrajeo y la energía destinada a esta actividad, disminuyendo los recursos destinados al crecimiento y metamorfosis (Venesky *et al.*, 2010). Por lo tanto, la pérdida de queratodontes observadas en las larvas de *L. luctator* expuestas a DG[®] podría afectar su capacidad alimenticia y de forrajeo, lo cual puede conducir a tasas más lentas de crecimiento y desarrollo (Bach *et al.*, 2016), afectando la supervivencia durante la etapa larval (Pérez-Iglesias *et al.*, 2015). Cabe destacar que también se observaron (aunque en menor proporción), anomalías a nivel de la cola y del intestino de las larvas expuestas al DG[®]. Las malformaciones en la cola afectan la actividad de natación, y por ende la

capacidad de alimentarse y de escapar a los depredadores (Sansiñena *et al.*, 2018, Quintaneiro *et al.*, 2018). Las anomalías a nivel del intestino también influyen negativamente en la alimentación, ya que afectan la capacidad de las larvas para absorber nutrientes (Sansiñena, 2020; Pavan *et al.*, 2021).

Los efectos del SM y sus FC han sido poco estudiados en anfibios; y no hay reportes de anomalías morfológicas provocadas por FC a base de SM sobre larvas de anuros. No obstante, las malformaciones encontradas en el presente estudio coinciden con varias de las anomalías reportadas para larvas de anuros expuestas a herbicidas (Lajmanovich *et al.*, 2003; Lenkowski *et al.*, 2007; Pérez-Iglesias *et al.*, 2015; 2019; Bach *et al.*, 2016; Quintaneiro *et al.*, 2018; Curi *et al.*, 2019; Pavan *et al.*, 2021; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022). Esto pone en evidencia el riesgo que corren los anfibios expuestos a estos contaminantes durante su etapa larval, ya que, como mencionamos anteriormente, la aparición de anomalías morfológicas puede afectar la alimentación y la actividad de nado de las larvas; lo cual puede impactar negativamente en su crecimiento, desarrollo; y supervivencia.

MN y ENA

Nuestros resultados revelan que el FC DG[®] induce la formación de MN y de otras ENA en larvas de *L. luctator*, confirmando el potencial genotóxico y citotóxico crónico de este herbicida. La presencia de ENA complementa el análisis de MN en las evaluaciones de genotoxicidad (Cavas & Ergene-Gözükar, 2005; Benvindo-Souza *et al.*, 2020). El aumento en la frecuencia de aberraciones nucleares revelaría una reacción celular adversa y/o un mecanismo de defensa para eliminar células genéticamente dañadas (Ray *et al.*, 2005). En este sentido, Barni *et al.* (2007), plantean que la inducción de MN en conjunto con ENA puede conducir a diversos escenarios de daño a nivel celular y muerte. El efecto geno-citotóxico de FC a base de SM fue reportado en células del hepatoma humano (Nikoloff *et al.*, 2013). En este estudio, pudimos observar que las frecuencias de MN y ENA en larvas expuestas a 1 mg/L de SM durante 25 días, fueron significativamente mayores que las reportadas para larvas de *L. luctator* expuestas de forma aguda durante 48 y 96 horas, a la misma concentración del FC DG[®] (ver capítulo 3). Estos resultados demuestran que, a mayor tiempo de exposición, mayor es la toxicidad del herbicida sobre las larvas de *L. luctator*.

Al analizar la frecuencia de los distintos tipos de aberraciones nucleares observadas en los eritrocitos de larvas expuestas al SM, notamos un claro predominio de células binucleadas (BE). La presencia de BE es un indicador de división celular anormal, ya que estas se originan por el bloqueo de la citocinesis (Cavas *et al.*, 2005; Mahboob *et al.*, 2014). Por tener un origen similar a los MN (fallos durante el proceso de mitosis), la aparición de BE se considera un suceso genotóxico (Serrano-García & Montero-Montoya, 2001). La formación de células multinucleadas, como BE; puede

relacionarse con el desarrollo de diversas patologías, entre ellas, el cáncer (Rodilla, 1993). Se observó una mayor frecuencia de ANE en relación con los MN, como ha sido reportado en estudios previos (Pollo *et al.*, 2016). Cabe destacar que en este estudio se reconocieron aberraciones nuevas en los eritrocitos, que no fueron observadas en los estudios previos de genotoxicidad aguda para larvas de *L. luctator* expuestas a DG[®], por ejemplo: células con dos MN; células multinucleadas (con más de dos núcleos) y BE con uno y dos MN. Por lo tanto, el mayor tiempo de exposición también propicia la aparición de otros tipos de ENA en las larvas expuestas al herbicida.

Por lo expuesto anteriormente, se puede concluir que el formulado comercial DG[®] produce daños significativos a nivel celular en larvas de *L. luctator*. Destacamos la importancia de utilizar formulados comerciales la hora de evaluar el efecto genotóxico de los plaguicidas, ya que es la forma en la que se aplican en el campo, y además estudios previos han demostrado un mayor potencial genotóxico de los FC en comparación con los ingredientes activos (Nikoloff *et al.*, 2013; Lajmanovich *et al.*, 2014). Adicionalmente, Bach *et al.* (2016), encontraron que el FC Roundup ULTRA MAX[®], fue más tóxico que el i.a glifosato sobre larvas de *L. luctator* expuestas, en todos los puntos finales evaluados (mortalidad, actividad de nado, crecimiento, desarrollo y anomalías morfológicas). Estos resultados estarían indicando que otros ingredientes que componen los FC influyen en la toxicidad de los plaguicidas sobre los anfibios.

BIBLIOGRAFÍA

- Altig, R. & McDiarmid, R.W. (1999). Body plan: development and morphology. En McDiarmid, R.W. & Altig, R. (Eds.), *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae* (pp. 24-51). Chicago: University of Chicago Press.
- Altwegg, R., & Reyer, H. U. (2003). Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, 57(4), 872-882.
- Araújo, C. V., Shinn, C., Moreira-Santos, M., Lopes, I., Espindola, E. L., & Ribeiro, R. (2014). Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles. *Aquatic toxicology*, 146, 70-75.
- Atwood, D. & Paisley-Jones, C. (2017). Pesticides Industry Sales and Usage 2008-2012. U.S. EPA, pp. 1–24. Disponible en: https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf.
- Ayres, M., Júnior Aires, M., Ayres, D. L., & Santos, A. D. A. S. (2007). Bio Estat 5.0: aplicações estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas. In *Bio Estat 5.0: aplicações estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas* (pp. 364-364).
- Babini, M. S., Bionda, C. D. L., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2016). Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-14.

- Bach, N. C., Natale, G. S., Somoza, G. M., & Ronco, A. E. (2016). Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 23959-23971.
- Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297.
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., & Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 45-54.
- Barreto, E., Salgado Costa, C., Demetrio, P., Lascano, C., Venturino, A., & Natale, G. S. (2020). Sensitivity of *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) tadpoles to environmentally relevant concentrations of Chlorpyrifos: effects at the individual and biochemical levels. *Environmental toxicology and chemistry*, 39(4), 834-841.
- Benvindo-Souza, M., Oliveira, E. A. S., Assis, R. A., Santos, C. G. A., Borges, R. E., e Silva, D. D. M., & de Souza Santos, L. R. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240, 124910.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123-2136.
- Carreira, S., & Maneyro, R. (2015). *Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay: Una Evaluación del Estado de Conservación de la Herpetofauna de Uruguay sobre la Base de los Criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza*. MVOTMA, Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, Dirección Nacional de Medio Ambiente.
- Çavaş, T., & Ergene-Gözükara, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology*, 74(3), 264-271.
- Cavas, T., Garanko, N. N., & Arkhipchuk, V. V. (2005). Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, 43(4), 569-574.
- Chai, L., Dong, S., Zhao, H., Deng, H., & Wang, H. (2016). Effects of fluoride on development and growth of *Rana chensinensis* embryos and larvae. *Ecotoxicology and environmental safety*, 126, 129-137.
- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C., Attademo, M. A., Seib, S., Simoniello, M. F., & Lajmanovich, R. C. (2017). Altered development, oxidative stress and DNA damage in *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) larvae exposed to poultry litter. *Ecotoxicology and environmental safety*, 143, 62-71.
- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Sandoval, M. T., & Lajmanovich, R. C. (2019). Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2, 4-D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230, 1-15.

- Cuzziol Boccioni, A. P., Lener, G., Peluso, J., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Aronzon, C., ... & Lajmanovich, R. C. (2022). Comparative assessment of individual and mixture chronic toxicity of glyphosate and glufosinate ammonium on amphibian tadpoles: A multibiomarker approach. *Chemosphere*, 309, 136554.
- De Liguoro, M., Bona, M. D., Gallina, G., Capolongo, F., Gallochio, F., Binato, G., & Di Leva, V. (2014). A monitoring of chemical contaminants in waters used for field irrigation and livestock watering in the Veneto region (Italy), using bioassays as a screening tool. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 3546-3557.
- Distel, C. A., & Boone, M. D. (2011). Pesticide has asymmetric effects on two tadpole species across density gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3), 650-658.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455:8195.
- Gilliom, R. J., Barbash, J. E., Crawford, C. G., Hamilton, P. A., Martin, J. D., Nakagaki, N., ... & Wolock, D. M. (2006). *Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992–2001* (No. 1291). US Geological Survey.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3), 411-421.
- Gupta, R.C. (2014). Respiratory toxicity biomarkers. *Biomarkers in Toxicology 2014*: 216-239.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1):9.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., ... & Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), 40-50.
- Heyer, R., Langone, J., La Marca, E., Azevedo-Ramos, C., di Tada, I., Baldo, D., Lavilla, E., Scott, N., Aquino, L., & Hardy, J. (2010). *Leptodactylus latrans*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T57151A11592655. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T57151A11592655.en>. Accessed on 23 February 2023.
- Hopkins, W. A. (2007). Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR journal*, 48(3), 270-277.
- Howe, C. M., Berrill, M., Pauli, B. D., Helbing, C. C., Werry, K., & Veldhoen, N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(8), 1928-1938.
- Josende, M. E., Tozetti, A. M., Alalan, M. T., Mathies Filho, V., da Silva Ximenez, S., da Silva Júnior, F. M. R., & Martins, S. E. (2015). Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators*, 49, 83-87.
- Junges, C. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Zenklusen, M. C., & Basso, A. (2012). Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish–tadpole interaction. *Chemosphere*, 87(11), 1348-1354.

- Krishnamurthy, S. V., & Smith, G. R. (2011). Combined effects of malathion and nitrate on early growth, abnormalities, and mortality of wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. *Ecotoxicology*, 20, 1361-1367.
- Krutz, L. J., Senseman, S. A., Zablotowicz, R. M., & Matocha, M. A. (2005). Reducing herbicide runoff from agricultural fields with vegetative filter strips: a review. *Weed Science*, 53(3), 353-367.
- Lajmanovich, R. C., Sandoval, M. T., & Peltzer, P. (2003). Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed by glyphosate formulations.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna, M., Peltzer, P. M., Stringhini, G. A., & Attademo, A. M. (2005). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1-2), 67-72.
- Lajmanovich, R. C., & Peltzer, P. M. (2008). Plan de monitoreo ambiental para el estudio del impacto de cultivos extensivos de arroz sobre el macrosistema Iberá. *Cátedra de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral-CONICET. Disponible en* < http://www.centromandela.com/documentos/Plan_Monitoreo_Ibera_FINAL.pdf>. Consultado el, 15, 2011.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Junges, C. M. (2012). Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Química Viva*, 11(3), 184-198.
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Basso, A. (2013). Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224, 1-13.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Bassó, A., & Lorenzatti, E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 7-12.
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Maglianese, M., ... & Beccaria, A. J. (2015). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. *Environmental Research*, 136, 205-212.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Junges, C. M., & Martinuzzi, C. S. (2017). Acute toxicity of apple snail *Pomacea canaliculata*'s eggs on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Toxin Reviews*, 36(1), 45-51.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., Attademo, A. M., Colussi, C. L., & Basso, A. (2018). Acute toxicity of colloidal silicon dioxide nanoparticles on amphibian larvae: emerging environmental concern. *International Journal of Environmental Research*, 12, 269-278.
- Lajmanovich, R. C., Cuzziol Boccioni, A. P., Curi, L. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C., Bassó, A., Colussi, C., & Peltzer, P. M. (2021). Técnicas para el relevamiento de anfibios en ambientes contaminados. Pereyra, L., Etchepare, E., & Vaira, M (eds.): In:

- Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina.* (pp. 326-347). Universidad Nacional de Jujuy, Argentina.
- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., & Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064.
- Livingstone, D. R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 57(3), 195-211.
- Magalhães, F. D. M., Lyra, M. L., De Carvalho, T. R., Baldo, D., Brusquetti, F., Burella, P., ... & Garda, A. A. (2020). Taxonomic review of South American Butter Frogs: Phylogeny, geographic patterns, and species delimitation in the *Leptodactylus latrans* species group (Anura: Leptodactylidae). *Herpetological Monographs*, 34(1), 131-177.
- Mahboob, S., Al-Balwai, H. F. A., Al-Misned, F., & Ahmad, Z. (2014). Investigation on the genotoxicity of mercuric chloride to freshwater *Clarias gariepinus*. *Pak. Vet. J*, 34(1), 100-103.
- Maneyro R. & Carreira S. (2012). Guía de anfibios del Uruguay. 2da ed, Colección Ciencia amiga-Ediciones de la Fuga. Montevideo, Uruguay, 207 pp.
- Manual de Plaguicidas de Centroamérica. (2022). Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Universidad Nacional de Costa Rica. Último acceso: 24 de noviembre 2022. Disponible en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/388-metolachlor>.
- Margolin, B. H., Collings, B. J., & Mason, J. M. (1983). Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments with binomial responses. *Environmental mutagenesis*, 5(5), 705-716.
- Martino, D., Methol, M., Oleaga, A., Pirelli, H., Rodríguez, L. & Vidal, L. (2008). Cambios en el uso de la tierra. *GEO Uruguay*, 56-117.
- Meintières, S., Biola, A., Pallardy, M., & Marzin, D. (2001). Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. *Mutagenesis*, 16(3), 243-250.
- Nardo, D., Evia, G., Castiglioni, E., Egaña, E., Galieta, G., Laporta, M., & Chichet, M. E. N. (2015). Determinación de glifosato mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) en el paisaje protegido Laguna de Rocha y su entorno, Uruguay. *Innotec*, (10), 64-70.
- Natale, G. S., Vera-Candioti, J., de Arcaute, C. R., Soloneski, S., Larramendy, M. L., & Ronco, A. E. (2018). Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 471-479.
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 11140605, S-Metolachlor. Retrieved November 18, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/S-Metolachlor>.
- Nikoloff, N., Escobar, L., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2013). Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and chemical toxicology*, 62, 777-781.

- Nikoloff, N., Natale, G. S., Marino, D., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2014). Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 275-281.
- Observatorio Ambiental Nacional. (2022). Datos abiertos. Datos propios y de otras instituciones vinculadas a la gestión ambiental. Ministerio de Ambiente. Montevideo, Uruguay. Último acceso: 24 de noviembre 2022. Disponible en: <https://www.ambiente.gub.uy/oan/datos-abiertos/>.
- PAN Pesticide Database. (2022). Metolachlor, (S). Pesticide Action Network, North America. Último acceso: 24 de noviembre 2022. Disponible en: <https://www.pesticideinfo.org/chemical/PRI4201>.
- Paunescu, A., Soare, L. C., Fierascu, R. C., Fierascu, I., & Ponopal, M. C. (2018). The influence of six pesticides on physiological indices of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 100, 376-383.
- Pavan, F. A., Samojeden, C. G., Rutkoski, C. F., Folador, A., Da Fré, S. P., Müller, C., ... & Hartmann, M. T. (2021). Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2, 4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 85, 103637.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Repetti, M. R., ... & Beldoménico, H. (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.
- Pereira, G., Riero, M., Lajmanovich, R. C., & Maneyro, R. (In press.). Acute toxicity and genotoxicity of the S-metolachlor-based herbicide Dual Gold® on *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892) tadpoles (Anura: Leptodactyli-dae). *Limnetica*. DOI: 10.23818/limn.43.19.
- Pérez-Iglesias, J. M., de Arcaute, C. R., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G. S., & Larramendy, M. L. (2014). The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 120-126.
- Pérez-Iglesias, J. M., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G. S., & Larramendy, M. L. (2015). Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on monteideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 15-24.
- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., de Oliveira, C., & Natale, G. S. (2016). Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 9852-9861.
- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Natale, G. S., & de Oliveira, C. (2019). Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental pollution*, 244, 733-746.

- Pollo, F. E., Bionda, C. L., Salinas, Z. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2015). Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental monitoring and assessment*, 187, 1-9.
- Pollo, F. E., Grenat, P. R., Otero, M. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2016). Assessment in situ of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. *Ecotoxicology and environmental safety*, 133, 466-474.
- Pollo, F. E., Grenat, P. R., Salinas, Z. A., Otero, M. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2017). Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 18179-18187.
- Pollo, F. E., Grenat, P. R., Otero, M. A., Babini, S., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2019). Evaluation in situ of genotoxic and cytotoxic response in the diploid/polyploid complex *Odontophrynus* (Anura: Odontophrynidae) inhabiting agroecosystems. *Chemosphere*, 216, 306-312.
- Quintaneiro, C., Patrício, D., Novais, S. C., Soares, A. M. V. M., & Monteiro, M. S. (2017). Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos. *Science of the Total Environment*, 586, 390-400.
- Quintaneiro, C., Soares, A. M., & Monteiro, M. S. (2018). Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. *Chemosphere*, 194, 595-601.
- Ray, M. R., Basu, C., Mukherjee, S., Roychowdhury, S., & Lahiri, T. (2005). Micronucleus frequencies and nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of firefighters. *International Journal of Human Genetics*, 5(1), 45-48.
- Relyea, R. A., & Werner, E. E. (2000). Morphological plasticity in four larval anurans distributed along an environmental gradient. *Copeia*, 2000(1), 178-190.
- Rodilla, V. (1993). Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 300(3-4), 281-291.
- Rowe, C. L., Kinney, O.M., Fiori, A. P., & Congdon, J. D. (1996). Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. *Freshwater Biology*, 37, 723-730.
- Ruiz de Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J. M., Nikoloff, N., Natale, G. S., Soloneski, S., & Larramendy, 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. *Ecological indicators*, 45, 632-639.
- Samojeden, C. G., Pavan, F. A., Rutkoski, C. F., Folador, A., da Fré, S. P., Müller, C., ... & Hartmann, M. (2022). Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). *Scientific reports*, 12(1), 11926.
- Sansíñena, J. A., Peluso, L., Costa, C. S., Demetrio, P. M., Mac Loughlin, T. M., Marino, D. J., ... & Natale, G. S. (2018). Evaluation of the toxicity of the sediments from an agroecosystem to two native species, *Hyalella curvispina* (CRUSTACEA:

- AMPHIPODA) and *Boana pulchella* (AMPHIBIA: ANURA), as potential environmental indicators. *Ecological indicators*, 93, 100-110.
- Sansíñena, J. A. (2020). *Estudio de calidad ambiental con larvas de anfibios como bioindicadores* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Semlitsch, R. D., & Gibbons, J. W. (1988). Fish predation in size-structured populations of treefrog tadpoles. *Oecologia*, 75, 321-326.
- Serrano-García, L. & Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and molecular mutagenesis*, 38(1):38-45.
- Sidoli, P., Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., & Baran, N. (2016). Experimental and modeling of the unsaturated transports of S-metolachlor and its metabolites in glaciofluvial vadose zone solids. *Journal of Contaminant Hydrology*, 190, 1-14.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31:9-15.
- Smith, D. C. (1987). Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology*, 68(2), 344-350.
- Teplitsky, C., Plénet, S., & Joly, P. (2003). Tadpoles' responses to risk of fish introduction. *Oecologia*, 134, 270-277.
- Teplitsky, C., Plénet, S., Léna, J. P., Mermet, N., Malet, E., & Joly, P. (2005). Escape behaviour and ultimate causes of specific induced defences in an anuran tadpole. *Journal of evolutionary biology*, 18(1), 180-190.
- USEPA. (1975). USEPA 660/375-009. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians. United States Environmental Protection Agency. Manual. Washington, D.C., EUA, 62 pp.
- Van Buskirk, J. & Mccollum, S.A. (2000). Functional mechanisms of an inducible defence in tadpoles: morphology and behaviour influence mortality risk from predation. *Journal of Evolutionary Biology*, 13: 336-347. doi: 10.1046/j.1420- 9101.2000.00173.x.
- Vaz-Ferreira, R. & Gerhau, A. (1975). Comportamiento epimelético de la rana común *Leptodactylus ocellatus* (L.) (Amphibia, Leptodactylidae) I. Atención de la cría y actividades alimentarias y agresivas relacionadas. *Physis*, 34: 1-14.
- Venesky, M. D., Wassersug, R. J., & Parris, M. J. (2010). How does a change in labial tooth row number affect feeding kinematics and foraging performance of a ranid tadpole (*Lithobates sphenoccephalus*)?. *The Biological Bulletin*, 218(2), 160-168.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Kubec, J., Buric, M., & Kouba, A. (2019). Effects of s-metolachlor on early life stages of marbled crayfish. *Pesticide biochemistry and physiology*, 153, 87-94.
- Wassersug RJ, Yamashita M (2001) Plasticity and constraints on feeding kinematics in anuran larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 131:183–195.
- Wells, K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press.
- Williams, B. K., & Semlitsch, R. D. (2010). Larval responses of three Midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 819-827.

- Zemolin, C. R., Avila, L. A., Cassol, G. V., Massey, J. H., & Camargo, E. R. (2014). Environmental fate of S-Metolachlor: a review. *Planta daninha*, 32, 655-664.
- Zhang, W., Chen, L., Xu, Y., Deng, Y., Zhang, L., Qin, Y., ... & Diao, J. (2019). Amphibian (*Rana nigromaculata*) exposed to cyproconazole: changes in growth index, behavioral endpoints, antioxidant biomarkers, thyroid and gonad development. *Aquatic Toxicology*, 208, 62-70.
- Zar, J. H. (2010). Biostatistical Analysis, Fifth Edition, Prentice Hall, 944 pp.

Conclusiones generales de la Tesis y perspectivas de trabajo.

CONCLUSIONES GENERALES

Capítulo 1.

La especie *Phyllomedusa huringii* podría verse afectada por la pérdida de hábitat a causa de la forestación con pinos; lo cual la posiciona como una buena especie bioindicadora para estudios de monitoreo de las plantaciones de pinos en Uruguay. La elaboración de planes de gestión para la especie en sitios forestales resulta clave. Los efectos de la actividad agrícola y forestal sobre los anuros suelen ser más evidentes a nivel de los ensambles, motivo por el cual, la mayoría de los estudios están focalizados en comparar la riqueza y diversidad de especies entre sitios bajo el efecto de estas actividades productivas y sitios naturales. No obstante, dentro de los diferentes niveles de organización abordados en este capítulo, fue posible observar un efecto más evidente de la forestación a nivel celular, lo cual destaca la necesidad de estudiar los efectos a otras escalas (ej. nivel celular y fisiológico), incluyendo el uso de otros biomarcadores como indicadores enzimáticos de estrés oxidativo. Las alteraciones en los parámetros de las células sanguíneas en larvas de anuros son señales de alerta temprana frente a la perturbación ambiental, y deben ser tenidos en cuenta, antes de que aparezcan efectos más graves a niveles de organización superiores. La actividad forestal continúa expandiéndose en Uruguay; por lo cual, la información generada resulta crucial para la conservación de los ensambles de anfibios que habitan agroecosistemas forestales.

Capítulo 2.

Se comprobó la presencia de agroquímicos (destacándose el glifosato y su metabolito AMPA), en el 100% de los sedimentos provenientes de la forestación de Eucaliptus. Las larvas de *Physalemus gracilis* fueron sensibles a la exposición a los sedimentos contaminados provenientes del sitio forestal, que aumentan el riesgo de mortalidad, provocan cambios en el desarrollo, la aparición de malformaciones, y alteraciones en los parámetros de las células sanguíneas (presencia de micronúcleos y de otras aberraciones nucleares en los eritrocitos). La especie de estudio tiene hábitos bentónicos, por lo cual presenta un mayor riesgo de exposición a los contaminantes en los sedimentos, y podría considerarse como un organismo de prueba apropiado para la evaluación de la calidad de los sedimentos en sitios agrícolas. Los mayores efectos tóxicos sobre los distintos puntos finales biológicos evaluados en *P. gracilis* se detectaron en las larvas expuestas a los sedimentos de uno de los charcos del sitio forestal, extraídos a los 15 días posteriores a la primera aplicación de agroquímicos. Por este motivo, resulta clave monitorear el estado de las poblaciones de anfibios presentes en los cuerpos de agua, inmersos en estos agroecosistemas, durante las primeras etapas del manejo forestal con plaguicidas. Nuestros resultados estarían indicando que la mezcla de herbicidas presentes en los sedimentos, potencia los efectos tóxicos sobre las

larvas expuestas en los mesocosmos. Cabe destacar, que este sería el primer antecedente para Uruguay, acerca del impacto de los sedimentos contaminados por agroquímicos utilizados durante el manejo forestal, sobre larvas de anfibios autóctonos, destacando la necesidad de implementar la gestión de sedimentos en los cuerpos de agua dentro de sistemas agrícolas.

Capítulos 3 y 4

Las larvas de *Leptodactylus luctator* han demostrado ser sensibles frente al herbicida Dual Gold® a base de S-metolacloflo (SM), un compuesto muy utilizado en la actividad forestal en Uruguay. La exposición aguda (24 y 96 h) a este herbicida tuvo efectos sobre la mortalidad de las larvas; y provocó la inducción de micronúcleos; y de otras aberraciones nucleares en los eritrocitos de sangre periférica de las larvas expuestas, confirmando el potencial geno-citotóxico del herbicida sobre la especie. Destacamos la importancia de los biomarcadores sanguíneos como señales de alerta temprana para detectar los efectos adversos causados por los agroquímicos. Además, la exposición crónica a concentraciones subletales del herbicida DG® provocó un retraso en el crecimiento, en el desarrollo, la aparición de anomalías morfológicas, y también la inducción de micronúcleos y aberraciones nucleares en los eritrocitos de larvas de *L. luctator*. Las alteraciones producidas durante la etapa larval, además de perjudicar a los organismos en su ambiente natural, comprometen el éxito reproductivo, y supervivencia de los individuos adultos. Teniendo en cuenta los resultados encontrados, los posibles efectos adversos a futuro, y que el SM es uno de los herbicidas más utilizados en la agricultura a nivel mundial junto con la Atrazina y el Glifosato, se considera que el herbicida DG® a base de SM representa un riesgo para los anfibios que se desarrollan en sitios agrícolas.

Los resultados obtenidos destacan la necesidad de continuar profundizando en el conocimiento de los efectos crónicos de los distintos formulados comerciales de agroquímicos sobre las primeras etapas de vida de los anfibios. Esta información resulta clave para poder mitigar los efectos de los contaminantes, y contribuir a la conservación de este grupo zoológico que atraviesa graves problemas de conservación a nivel mundial. En el Bioma Pampa, la actividad agrícola desempeña un papel central, y este estudio sería el primero en evaluar los efectos de la toxicidad aguda (CL₅₀), la citogenotoxicidad y los efectos a nivel individual de un herbicida a base de SM sobre anfibios en la región. Finalmente, cabe destacar que *L. luctator* podría ser un buen candidato para transformarse en un organismo modelo en la región para evaluar el riesgo potencial de la utilización de pesticidas. Se trata de una especie que ha demostrado ser sensible a distintos herbicidas e insecticidas, y que presenta una amplia distribución en el bioma pampa. Los resultados de este estudio podrían servir de referencia para desarrollar otros estudios de toxicidad en agroecosistemas de la región.

PERSPECTIVAS DE TRABAJO

Se le dará continuidad a esta línea de investigación en el Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados-Herpetología, a través del desarrollo del Proyecto titulado “Anfibios como bioindicadores de calidad ambiental en agroecosistemas frutícolas del Uruguay”; aprobado en la última convocatoria de Proyectos Fondo Clemente Estable de la ANII, del cual soy responsable científico. A través de este proyecto se buscará conocer el efecto de algunos de los agroquímicos (AQ) utilizados en la fruticultura de hoja caduca (FHC) en Uruguay, sobre anfibios autóctonos. La FHC es una actividad productiva relevante en nuestro país, que implica un manejo muy intensivo a nivel de cantidad de AQ utilizados y de frecuencia de aplicación, sobre todo para las plantaciones de manzanos, el cultivo más importante en Uruguay (Altieri *et al.*, 2014; Escanda, 2021). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de sus impactos a nivel ambiental, especialmente sobre la biota. Por este motivo proponemos la utilización de larvas de anfibios como bioindicadores ambientales, con el objetivo de desarrollar una herramienta alternativa para el biomonitoreo en agroecosistemas frutícolas. Cabe destacar que incorporaremos el uso de biomarcadores que no fueron utilizados en la presente Tesis para evaluar el efecto de los AQ sobre las larvas de anuros, como los bioquímicos; particularmente las alteraciones en la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa, glutatión S-transferasa, y catalasa; y los etológicos o comportamentales (principalmente alteraciones a nivel de la actividad de nado). Además, se trabajará con otros tipos de AQ como funguicidas (ej. Captan y Mancozeb).

Adicionalmente seguiré participando en la orientación de dos tesinas de grado que se están desarrollando en el laboratorio, dentro de la temática de la Ecotoxicología de anfibios. En una de ellas, se están estudiando los efectos de toxicidad aguda y genotoxicidad del herbicida Sulfentrazone, sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (anura: Leptodactylidae). Este herbicida fue uno de los más persistentes en los sedimentos analizados durante el desarrollo de esta Tesis (ver capítulo II), lo cual motivo su elección para el referido trabajo de fin de carrera. La otra Tesina que se está desarrollando, tiene como objetivo evaluar la potencial toxicidad de los sedimentos asociada al uso intensivo de agroquímicos relacionados con la FHC, sobre larvas de anuros.

Como se mencionó anteriormente en esta Tesis; la información vinculada con los efectos de la actividad agrícola sobre anfibios del Uruguay es escasa; por lo cual considero que todos estos estudios aportarán información de suma relevancia que permitirá generar una base sólida para consolidar esta línea de investigación en el país, y aportar herramientas para la conservación de los anfibios del Uruguay. A futuro sería muy interesante incorporar otras técnicas para abordar los daños a nivel del ADN provocados por la exposición a agentes contaminantes, como por ejemplo el Ensayo Cometa, y de esta manera complementar las técnicas que se han utilizado. Además,

considerando los efectos sinérgicos de toxicidad que pueden tener las mezclas de herbicidas sobre las larvas de anuros, sería interesante realizar bioensayos de exposición a mezclas equitóxicas y no equitóxicas de estos compuestos. Teniendo en cuenta que existe una falta general de información acerca de la toxicidad de los metabolitos de AQ y sus mezclas en el medio ambiente (Rozmankova *et al.*, 2020), creemos que sería clave poder estudiar el efecto de distintos metabolitos, ya que pudimos comprobar su persistencia en los sedimentos, y muchas veces son incluso más persistentes que los propios compuestos originales (como es el caso del metabolito AMPA del glifosato (González & Fuentes, 2022); o se detectan en mayores concentraciones que estos en agua, pudiendo ser tan o más activos (Elliott & VanderMeulen, 2017).

Finalmente creemos que es necesario implementar los trabajos a campo, donde se pueda evaluar *in situ* el efecto de los AQ sobre larvas de anuros expuestas durante su desarrollo, por ejemplo, mediante la realización de experimentos utilizando limnocorrales. Esto nos permitiría estudiar tales efectos en condiciones realistas de exposiciones crónicas, a bajas concentraciones de mezclas de agroquímicos. Además, muchos de estos compuestos químicos pueden interactuar con factores ambientales (por ej. el pH del agua) y provocar efectos aditivos o sinérgicos (ej. Chen *et al.*, 2004). Este tipo de abordaje resulta clave para seguir contribuyendo al conocimiento de los efectos de los agroquímicos sobre los anfibios, y poder realizar evaluaciones de riesgo ecotoxicológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Altieri, M. A., Nicholls, C. I., & Montalba, R. (2014). El papel de la biodiversidad en la agricultura campesina en América Latina. *LEISA revista de agroecología*, 30(1), 5-8.
- Chen, C. Y., Hathaway, K. M., & Folt, C. L. (2004). Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(4), 823-831.
- Elliott, S. M., & VanderMeulen, D. D. (2017). A regional assessment of chemicals of concern in surface waters of four Midwestern United States national parks. *Science of the Total Environment*, 579, 1726-1735.
- Escanda, M.C. 2021. Fruticultura de hoja caduca. Registro nacional frutícola 2020. INIA. Seminario de Pepita 8p. Serie Actividades de Difusión N°798.
- González Ortega, E., & Fuentes Ponce, M. H. (2022). Dinámica del glifosato en el suelo y sus efectos en la microbiota. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 38.
- Rozmánková, E., Pípal, M., Bláhová, L., Chandran, N. N., Morin, B., Gonzalez, P., & Bláha, L. (2020). Environmentally relevant mixture of S-metolachlor and its two metabolites affects thyroid metabolism in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 221, 105444.

ANEXO I



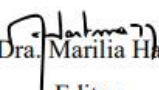
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - CAMPUS ERECHIM
ERS 135 – Km 72, nº 200, Caixa Postal 764, Erechim-RS, CEP 99700-970, 54 3321 7099
www.uffrs.edu.br

*Dear Gisela Pereira, Ernesto Elgue, Mariabelén Riero, Rafael Lajmanovich and
Raúl Maneyro*

Congratulations! We are pleased to share that your chapter "**Effects of forestry activity on anuran amphibians: A case study in Uruguay**" has been accepted for publication in book: "**Water, Pesticides, Organisms: Current Approach of Ecotoxicology**", which will be published by Nova Publishers.

Thank you for your contribution,

Sincerely,


Prof. Dra. Marília Hartmann
Editor

Chapter 18

Effects of Forestry Activity on Anuran Amphibians: A Case Study in Uruguay

Gisela Pereira^{1,*}

Ernesto Elgue¹

Mariabelén Riero¹

Rafael Lajmanovich²

Raúl Maneyro¹

¹Laboratory of Systematics and Natural History of Vertebrates – Herpetology, Faculty of Sciences, University of the Republic, Montevideo, Uruguay

²Laboratory of Ecotoxicology, Faculty of Biochemistry and Biological Sciences, National Council for Scientific and Technical Research, Buenos Aires, Argentina

Abstract

In Uruguay, forestry activity has grown in recent years, surpassing one million hectares. Monocultures cause modifications in landscape structure, reduction of environmental heterogeneity, and impacts on associated ecosystems, among other factors, due to the use of agrochemicals. Pesticides and their metabolites are detected in soils and surface water bodies, where they can persist and cause adverse effects on aquatic organisms, such as anuran tadpoles. For this reason, and due to their high sensitivity, amphibians are a good biological model to study the effect of these contaminants. There are few studies evaluating the effect of forestry activity on Uruguay's amphibian assemblages. In this study, changes in the richness and composition of anuran assemblages associated with forestry activity were analysed, and the incidence of this activity on the body condition and

* Corresponding Author's Email: gisepe04@gmail.com.

parameters of blood cells (presence of Micronuclei (MN) and other nuclear abnormalities of erythrocytes (ANE)) in individuals of *Pseudis minuta* (biomarkers of genetic damage caused by exposure to contaminants in water) was determined. Seasonal samplings of calling males and tadpoles were carried out at two pine-forested sites (FA=active forestry and FB=recently harvested zone) and one control site (NF). Comparison of richness between study sites was based on rarefaction curves; and to assess differences in species composition, a PERMANOVA was performed. The richness and species composition of the control and forest sites were similar. No differences were found in the body condition of *P. minuta* individuals between study sites, but it was observed that the frequency of MN+ANE in tadpoles from the forest site was significantly higher than in tadpoles from the control site. Forestry activity continues to expand in Uruguay; therefore, the generated information is crucial for the conservation of amphibian assemblages inhabiting forest agroecosystems. These results highlight the importance of evaluating the possible effects of forestry activity with pine trees on amphibians at other levels of organization (e.g. celular and physiological levels).

Keywords: Pine afforestation, species richness, body condition, agrochemicals, blood cell parameters, anurans, Uruguay

Agricultural intensification and its main environmental effects

In recent years, agricultural activity has intensified and expanded significantly in South America (Paruelo et al., 2006; Graesser et al., 2018; Baeza & Paruelo, 2020). This phenomenon is mainly a consequence of the incorporation of new technological packages including no-tillage farming, the use of transgenic seeds, and an increase in the application of agrochemicals (AC) such as pesticides and fertilizers (Lajmanovich et al., 2012). According to the FAO (Food and Agricultural Organization), plant pests cause the loss of up to 40% of food crops worldwide each year, which is why the use of pesticides is intensified to increase crop yields. The increase in AC use may also result from the continuous application of the same commercial formulations, leading to the emergence of resistance in target organisms (Coalova et al., 2012), which

can result in an increase in dosage and quantity of applications. Among the primary consequences of the increased use of AC is the negative impact they can have on the environment. Generally, only 0.1% of the pesticide applied reaches the target pest, while the remainder circulates in the environment, acting as a source of emerging contamination for soil, water, and biota (Carvalho et al., 1998). In this sense, various AC used in agriculture and their metabolites are frequently detected contaminating soils and surface water bodies (Gilliom et al., 2006; De Liguoro et al., 2014; Nardo et al., 2015; Soutullo et al., 2020); often reaching them through runoff (Martino et al., 2008). Additionally, several chemicals tend to persist in water and even accumulate in sediments, where they can cause toxicity to non-target aquatic organisms (Fojut et al., 2013; Zhelev et al., 2018). The final fate and persistence of pesticides in the environment are complex and depend on several interrelated factors, including environmental conditions, the specific characteristics of the compounds, as well as the contaminated site and soil (Tellechea et al., 2007).

In addition to the adverse effects associated with the use of AC, agricultural activities, such as large-scale forestry, induce modifications in landscape structure and a reduction in environmental heterogeneity, which can negatively impact herpetofaunal diversity (Parris & Lindenmayer, 2004; Machado et al., 2012; Gainsbury & Colli, 2014; Saccol et al., 2017; Allingham, 2020; Kellermann et al., 2021). Several studies have demonstrated that complex environments, which provide a greater variety of microhabitats, harbour higher species richness of amphibians compared to homogeneous environments (e.g. Afonso & Eterovick, 2007; Bastazini et al., 2007; Keller et al., 2009; Silva et al., 2012; Figueiredo et al., 2019). Additionally, forest monocultures generate other impacts on ecosystems that can directly or indirectly affect biota, such as: reduction in hydrological yield, deterioration of water and soil quality, modification of nutrient cycles, physicochemical variations at the soil level (e.g. pH decline) (Le Maitre et al., 2000; Jackson et al., 2002; Nasetto et al., 2005; Jobbágy et al., 2006); as well as an increase in shading (Means et al., 1996; Parris & Lindenmayer, 2004; Machado et al., 2012), among others. It has also been demonstrated that pine afforestation generates various impacts on natural ecosystems due to its high invasion potential (Richardson et al., 1994; Bustamante & Simonetti, 2005; Zalba et al., 2009; Machado et al., 2012). It is noteworthy that the effect of afforestation is not only perceived as the transformation of the environment's structure during the planting period but also during the post-harvest stage (Knapp et al., 2003).

Forestry activity in Uruguay

In Uruguay, as in the rest of South America, one of the main changes in land use is the transformation of large areas of natural grasslands into forestry monocultures (Nosetto et al., 2005; Fonseca et al., 2009; Veldman et al., 2015; Baeza & Paruelo, 2020). In recent decades, there has been significant expansion of plantations of fast-growing exotic trees (mainly eucalyptus and pine), aimed at timber and cellulose production, currently surpassing one million hectares (MGAP-DGF, 2021). As a consequence of agricultural and forestry activity, between the period from 1985 to 2022, 2 million hectares (16.8%) of natural grasslands in the country were lost (Mapbiomas Pampa Trinacional Project, 2023). Pinus tree plantations (with predominance of species *Pinus elliottii* and *P. taeda*) occupy 14.2% of the total forested area in Uruguay, mainly concentrated in the departments of Rivera, Tacuarembó, Cerro Largo, and Treinta y Tres (MGAP-DGF, 2021). On the other hand, Eucalyptus tree plantations are more representative in the country, occupying 54.7% of the total forested area, with predominance of species *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii*, mainly concentrated in the departments of Río Negro, Rivera, Cerro Largo, and Paysandú (MGAP-DGF, 2021). The growth of afforestation began in the 1990s, driven by Law No. 15.939, which established significant tax benefits for forests planted in priority forest areas. Accompanying the agricultural and forestry expansion in Uruguay, and aiming to increase crop yields, there has been a significant increase in the importation and consumption of agrochemicals, which rose from 1.762 tonnes in 1990 to an average of 13.000 tonnes annually between 2015-2019 (Cárcamo, 2020).

Afforestation as a determinant of amphibian community structure

Amphibians are the most threatened vertebrates worldwide, with over 40% of species at risk of extinction (IUCN, 2023; Luedtke et al., 2023). According to the latest Red List of amphibians and reptiles of Uruguay, of the 49 amphibian species evaluated, twelve are in some category of threat, while four are considered "near threatened" (Carreira & Maneyro, 2015). Among the main threats to this group, both globally and locally, habitat destruction and fragmentation caused by changes in land use stand out (Collins & Crump,

2009; Carreira & Maneyro, 2019), primarily driven by agricultural activity and urbanization (IUCN, 2023). Amphibians are highly sensitive to environmental degradation due to several of their biological and physiological characteristics (Wells, 2007). Most species in the region have a double life cycle, with an aquatic larval phase and a terrestrial adult stage. This positions them as an ideal group for detecting variations in ecosystems, as they are exposed to alterations in both aquatic (receiving pollution) and terrestrial environments and respond to changes in environmental conditions in both ecosystems (Stebbins & Cohen, 1995; Cushman, 2006; Becker et al., 2007). They also have thin, permeable skin, with little capacity to prevent the entry of various toxic substances dissolved in water, and exhibit a high rate of bioaccumulation compared to other animals in the same trophic position (Unrine et al., 2007). Additionally, they are animals that have low dispersal capacity and high site fidelity (Smith & Green, 2005; Caldwell & Shepard, 2007), making them particularly vulnerable to landscape alterations (Cushman 2006; Cayuela et al., 2015).

There is evidence that forestry monocultures reduce the richness of anuran amphibians and produce changes in assemblage composition (Parris & Lindenmayer, 2004; Machado et al., 2012; Gangenova et al., 2018). However, often the effects on anurans are more subtle than a change in species richness or composition, affecting, for example, the energetic state of individuals (Maneyro & Carreira, 2023), or causing changes in individual diets (Berazategui et al., 2007). On the other hand, agrochemicals used during forestry management may contaminate surface water bodies associated with these agroecosystems, leading to alterations in the blood parameters of exposed anuran tadpoles (cellular-level effects) (Babini et al., 2015; 2016). These alterations include the presence of Micronuclei (MN) and other nuclear abnormalities in erythrocytes (ANE), which are indicators of genetic damage (Benvindo-Souza et al., 2020). Due to their high sensitivity to environmental changes and their compliance with the main characteristics required of a biological indicator (e.g. being ubiquitous, abundant, easily detectable, easily sampled, and relatively sedentary, among other things) (see Metcalfe, 1989), amphibians are considered good indicators of environmental quality. Consequently, several studies have used them to address the effects of habitat degradation (e.g. Eterovick et al., 2016; Saccol et al., 2017; Bionda et al., 2018).

As previously mentioned, forestry activity has been steadily growing in Uruguay; however, studies evaluating the effect of this activity on amphibian assemblages are scarce (e.g. Maneyro & Carreira, 2023). The expansion of

silviculture accentuates the need for studies to understand the potential effects this activity may have on biota. Taking this aspect into consideration, this study aims to assess the effect of pine forestry activity on anuran amphibians in Uruguay. Among the specific objectives are: to analyze changes in the richness and composition of anuran amphibian assemblages between sites affected by afforestation and a control site within a protected area; to compare water quality between forestry sites and the control site; and to determine the impact of forestry activity on body condition and blood cell parameters of a species with great potential to be used as an indicator in Pampean environments.

Study Area and Sampling Sites

The study was conducted in the “Quebrada de los Cuervos and Sierras del Yermal” Protected Landscape (PPQC and SY) (32°55'39"S; 54°27'25"W), and surrounding areas (Treinta y Tres Department, central-east region of Uruguay) (Figure 1). The PPQC and SY includes a system of mountain ranges, which plays an important role as a connector between the various mountainous environments in the south of the country and the subtropical forests of Rio Grande do Sul (Brazil) (Rodríguez-Gallego, 2008). It is part of the group of gorges in northeastern Uruguay with remnants of subtropical forest and is part of the National System of Protected Areas (SNAP) of Uruguay since 2008 (Decree no. 462/008). Among the different environments present in the protected area, the stream and gallery forest along the river system stand out, as well as the natural grasslands (covering 50% of the area), which contain priority flora and fauna species for SNAP (SNAP, 2010). One of the main pressures currently occurring in the area adjacent to the PPQC and SY is the advancement of monoculture forestry with pine and eucalyptus (estimated at no less than 6000 hectares). All soils in the protected area and 90% of soils in the adjacent area are of forestry priority (SNAP, 2010). Therefore, the phenomenon of intensification and expansion of forestry in the area was due to state policies that benefited the ventures developed on these soils (Panario & Gutiérrez, 2007). In the study area, precipitation occurs throughout the year, but is higher during summer and autumn. For the past 50 years, the annual accumulated precipitation was 1600 mm, while the average annual temperature was 17°C (INIA, 2022).



Figure 1. Quebrada de los Cuervos and Sierras del Yermal. Photo: Ernesto Elgue.

Within the boundaries of the protected area, there is a zone of natural grassland that has been excluded from all livestock and any other anthropogenic activity for the past 20 years. This confers a significant degree of naturalness to this ecosystem, which has been significantly altered throughout Uruguay and the region. In this site, considered as the control area (hereinafter referred to as NF) (Figure 2), three water bodies were selected: Ch1NF (32.90579°S; 54.44522°W), Ch2NF (32.91276°S; 54.45073°W), and Ch3NF (32.91115°S; 54.45263°W) (Figure 3). Additionally, water bodies were selected within two sites affected by *Pinus taeda* afforestation, located in areas adjacent to the PPQC and SY, and within the same watershed. One of these sites corresponds to a recently harvested plantation (hereinafter FA) and is located 7.75 km from the control area; while, in the other site located 4.87 km from the control, there is an active plantation of nine-year-old pines (hereinafter FB) (Figure 1). Two water bodies were selected at each of these sites: Ch1FA, Ch2FA; Ch1FB, and Ch2FB, respectively (Figure 3). In the forestry sites, management was conducted for both insect and weed control. For insect control, baits with insecticides (fipronil and sulfuramid) were used during pre-planting, and directed (only on ant nests) in the post-planting stage.

Weed control differed in different stages: pre-tillage with herbicide glyphosate applied with a tractor, pre-planting again with glyphosate applied with a tractor, pre-emergent with the herbicides sulfometuron methyl and diclosulam applied in the planting row using a backpack sprayer; and post-planting, also in the planting row using a backpack sprayer with herbicides such as glyphosate, chlorpyralid, sulfometuron methyl, and diclosulam.

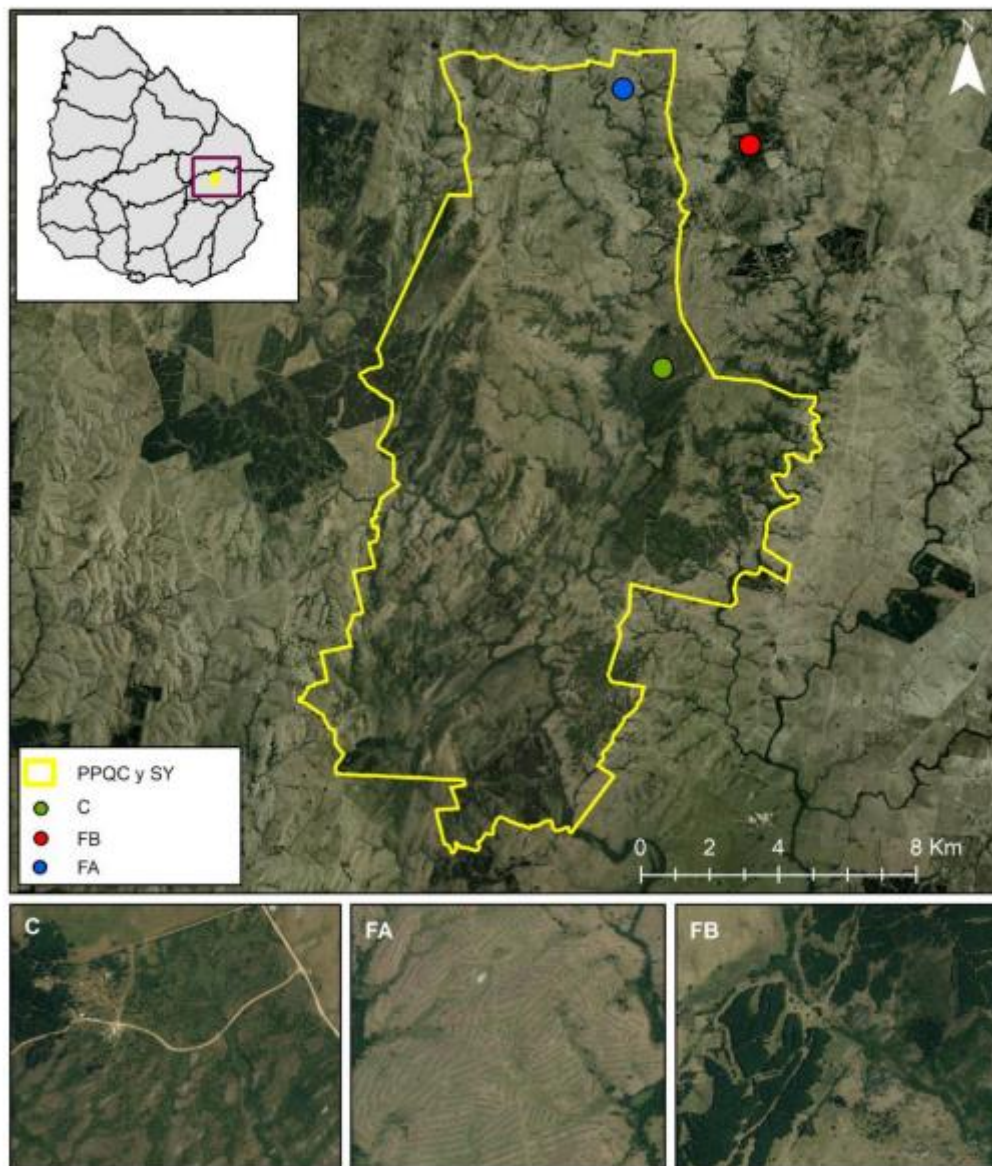


Figure 2. Study Area. The yellow line delineates the area of the Protected Landscape of Quebrada de los Cuervos and Sierras del Yermal. The green mark represents the

Control site (C); the red mark represents the location of the active pine plantation (FB); and the blue mark represents the harvested area (FA).



Figure 3. Sampling Sites. A. Pond Ch1NF within the control site (C); B. Pond Ch1FA within the harvested area (FA); C. Pond Ch2FB within the active pine plantation (FB). Photos: Gisela Pereira.

Amphibian richness and composition at sampling sites

Seasonal field trips of three days were conducted between September 2018 and March 2020. During each trip, auditive samplings of calling males and tadpoles sampling were performed at each selected pond to identify the anuran species present at each site. Fifteen-minute auditive samplings were conducted at night (Heyer et al., 1994), and a categorical quantification of vocalizations was performed using five categories: occasional (1 single individual calling), rare (2 to 4 individuals), abundant (more than 4 individuals, but countable), and chorus (individual vocalizations indistinguishable) (Moulton et al., 1996). Tadpoles sampling was conducted in the afternoon, during daylight hours. Two individuals performed random sweeps using hand nets at each monitoring pond, attempting to cover the entire surface area until reaching a sample size of at least 100 individuals per pond. Captured tadpoles were taxonomically identified to the species level and then released at the capture site. Tadpoles of species that could not be identified on site were placed in plastic containers with water from the site for transportation to the laboratory, where they were subsequently reared under controlled conditions: water-air temperature $22\pm1^{\circ}\text{C}$, photoperiod 12-12 (hours light-darkness), and constant aeration with bubblers until the completion of metamorphosis for accurate taxonomic identification. It is worth noting that all anuran species observed during both surveys were recorded.

Characterization of sampling sites

All ponds selected in NF, FA, and FB were characterized by the following variables: area, perimeter, and mean depth (using a plastic meter with 1mm precision). The percentage of organic matter and soil pH were also determined. For this purpose, soil samples were taken at a depth of five cm in each pond using an auger. Three soil samples were taken per pond, each composed of 10 subsamples. Each sample was placed in a portable cooler with ice packs for transport and sent to a specialized laboratory for analysis. During each auditive sampling of calling males and tadpoles sampling, water quality was determined by measuring pH, conductivity ($\mu\text{Ss-1}$), temperature ($^{\circ}\text{C}$), and dissolved oxygen percentage (mg L-1) in each pond using a multiparameter instrument (HACH® SensionTM156). The time, water appearance, and air temperature ($^{\circ}\text{C}$) were also recorded. Additionally, during each field trip, water samples were collected from each pond in the morning for subsequent quantification of dissolved nitrate, ammonium, and phosphate. All water samples were filtered and frozen for further analysis at the Limnology Laboratory of the Faculty of Sciences, where they were quantified using spectrophotometry.

Body Condition Index (BCI) in adult individuals of *Pseudis minuta*

Pseudis minuta (Anura: Hylidae) was selected as a bioindicator species in the study area due to its presence in all sampling sites. It is a species widely distributed in Uruguay, with aquatic habits, found in all natural areas of the country, and can also be found in anthropized environments (Maneyro & Carreira, 2012). It is not considered threatened at the national scale (Carreira & Maneyro, 2019) or globally (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2023). During the field trips in February, September, and November 2019, following nocturnal auditive samplings, adult individuals of *P. minuta* in reproductive activity (Figure 4a) were captured in the ponds of the control area (Ch1NF, Ch2NF, and Ch3NF) and in the ponds of sites affected by afforestation (Ch1FA, Ch2FA, Ch1FB, and Ch2FB). All captured individuals were sexed, and their size (SVL = snout-vent length in mm) and mass (M in grams) were determined in the field (Figure 4b), in order to determine the Body Condition Index (BCI). This index is an indicator of the energy state of the individuals (Băncilă et al., 2010). After recording all data, individuals were returned to the capture site.



Figure 4. (a) Pair of *Pseudis minuta* collected during sampling at the study site (they were in amplexus at the time of collection); (b) Determination of the mass of an adult individual of *P. minuta* in the field. Photos: Gisela Pereira

Parameters of blood cells (MN and ENA) in tadpoles of *Pseudis minuta*

In September 2018, eight tadpoles of *P. minuta* were collected from pond Ch1NF at the control site, and eight tadpoles from pond Ch2FB at the forested site, for the measurement of blood cell parameters. The tadpoles were euthanized following experimental protocols approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA) of the Faculty of Sciences (protocols 474 and 684). Blood was extracted from them, and duplicate smears were prepared and stained using the May-Grünwald Giemsa technique (Barni et al., 2007; Lajmanovich et al., 2014). The frequency of MN and ENA was determined in 1000 erythrocytes per tadpole using an Olympus BX41 optical microscope, with a magnification of 1000x (Lajmanovich et al., 2014). Coded and randomized slides were blindly scored by a single observer. Photographs of the smears were taken with an Evolution vf cooled color camera, and the images were processed using ImageJ Software (National Institute of Health, USA). MN were identified following the criteria of Fenech (2000) and

Meintières et al. (2001); and different ENA were classified according to the criteria of Carrasco (1990), Guilherme et al. (2008), and Lajmanovich et al. (2014).

Data analysis

Rarefaction curves were performed for each site using the richness data (Chao & Jost, 2012), and Bootstrap was used to calculate confidence intervals. The iNEXT package (iNterpolation and Extrapolation) of R Software was employed for this purpose (Hsieh et al., 2016). Differences in richness between sites were tested using the Kruskal-Wallis test, and comparisons among these sites considering the sampling time were assessed using the Friedman test. Variations in species composition among sites were evaluated using the complementarity index (C) by Colwell and Coddington (1994) (Moreno, 2001). Differences in composition between sites were assessed using PERMANOVA, with 999 permutations on a distance matrix computed using the Jaccard method (Borcard et al., 2011; Magurran & McGill, 2011). The vegan package (Oksanen et al., 2019) in R was used for this analysis. Differences in physicochemical water variables between sites were tested using the Kruskal-Wallis test. The Body Condition Index (BCI) of *P. minuta* individuals was determined based on the residuals of the $\text{Log}(M) = f[\text{Log}(SVL)]$ regression (Băncilă et al., 2010). Differences in BCI between treatments were evaluated using the Kruskal-Wallis test. For genotoxicity analyses, MN and ENA frequencies were considered together and expressed as the mean $\pm$ standard error. The MN+ENA data were analysed using the binomial proportion test (Margolin et al., 1983).

Statistical analyses were performed using PAST (Paleontological STatistics) Software version 2.17c (Hammer et al., 2001); InfoStat version 2020 (Di Rienzo et al., 2020); BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007); and R version 4.2.2 (R Core Team, 2022). Levene's test and Shapiro-Wilk (SW) test were used to assess homogeneity of variances and normality of data, respectively. The significance level was set at $\alpha=0.05$.

Characteristics of the sampling sites

Within the control site, pond Ch1NF has an area of 968.26 m², Ch2NF of 2531.11 m², and Ch3NF of 274.88 m². The water bodies Ch1FA and Ch2FA, located in the recently harvested site, have areas of 1314.61 m² and 1223.35

m², respectively. Within the active plantation, Ch1FB has an area of 158.16 m² and Ch2FB of 1223.35 m². The percentage of organic matter and soil pH was similar in the three study sites (Table 1). Soil analyses were conducted at the Agroindustrial Analytical Laboratory S.A (Paysandú; Uruguay). Regarding water physicochemical variables, no significant differences were found in the following parameters among the study sites: water temperature (°C) ($H=0.32$; $p=0.85$); pH ($H=0.13$; $p=0.94$); conductivity ($\mu\text{Ss-1}$) ($H=1.88$; $p=0.39$); dissolved oxygen (mg L^{-1}) ($H=5.11$; $p=0.08$); water depth (cm) ($H=0.04$; $p=0.98$); ammonia (mg/L) ($H=1.22$; $p=0.58$). No differences were observed in air temperature (°C) ($H=2.35$; $p=0.31$) among the sites either. However, significant differences were observed in nitrate concentration between the study ponds (mg/L) ($H=9.35$; $p<0.05$); with higher concentration in the FA site compared to the control ($p<0.05$). Differences were also found in phosphate concentration (mg/L) ($H=10.97$; $p<0.05$); with higher concentration in the FA site compared to the control and FB ($p<0.05$).

Table 1. Soil characterization at different sampling sites. References: FA: recently harvested site; FB: site with active afforestation. Analyses were conducted at the Agroindustrial Analytical Laboratory S.A (Paysandú; Uruguay)

Sitio de muestreo	Organic Matter (%)	pH
CONTROL	5.1	4.6
FA	5.5	5.2
FB	5.1	4.7

The amphibians present in the different study sites

Based on diurnal tadpoles samplings, nine species of anurans were identified at the control site ($S_{\text{Ch1NF}} = 7$; $S_{\text{Ch2NF}} = 3$; and $S_{\text{Ch5NF}} = 2$), eight species at the recently harvested site FA ($S_{\text{Ch1FA}} = 6$; and $S_{\text{Ch2FA}} = 6$), and nine species at the active afforestation site FB ($S_{\text{Ch1FB}} = 6$; $S_{\text{Ch2FB}} = 7$) (Table 2). During nocturnal auditive samplings of calling males, eleven species of anurans were identified at all sites, at the control site ($S_{\text{Ch1NF}} = 10$; $S_{\text{Ch2NF}} = 9$; and $S_{\text{Ch3NF}} = 6$), at the recently harvested site FA ($S_{\text{Ch1FA}} = 9$ and $S_{\text{Ch2FA}} = 10$), and at the active afforestation site FB ($S_{\text{Ch1FB}} = 7$ and $S_{\text{Ch2FB}} = 7$) (Table 2). It is worth noting that at sites Ch1NF; Ch2NF; Ch3NF; Ch2FA, Ch1FB; and Ch2FB, the calls of males from species belonging to the genus *Physalaemus* were recorded, but it was not possible to distinguish between the sympatric taxa *Physalaemus*

gracilis and *P. biligonigerus* through auditive recording (Table 2). During diurnal and nocturnal samplings, thirteen species of anurans were visually identified at the control site ($S_{Ch1NF} = 10$; $S_{Ch2NF} = 6$; and $S_{Ch3NF} = 4$); ten species at site FA ($S_{Ch1FA} = 8$ and $S_{Ch2FA} = 6$); and twelve species at FB ($S_{Ch1FB} = 7$ and $S_{Ch2FB} = 11$) (Table 2). Therefore, considering the different sampling methods and the species observed during each of these events, a total of 16 anuran species were recorded at the control site distributed across three families: Hylidae (8 species), Leptodactylidae (7), and Odontophrynidae (1). On the other hand, at site FA, a total of 15 species were recorded distributed across 4 families: Hylidae (7 species), Leptodactylidae (7), Microhylidae (1), and Odontophrynidae (1), while at site FB, 16 species belonging to the families: Hylidae (7 species), Leptodactylidae (7), Microhylidae (1), and Odontophrynidae (1) were recorded (Table 2).

In summary, a total of 17 amphibian species were recorded, representing almost 35% of the species present in Uruguay. With the exception of *Dendropsophus minutus*, which is found in the departments of Treinta y Tres and Cerro Largo and is locally threatened; the rest of the species are common within the amphibian fauna of Uruguay, showing a wide distribution, and are not in any threat category according to the latest Red List of amphibians and reptiles of Uruguay (Carreira & Maneyro, 2015; Maneyro et al., 2019). It is worth mentioning that the species *Phyllomedusa huringii* inhabits much of the Uruguayan territory but is primarily associated with riparian forest ecosystems (Maneyro & Carreira, 2012). The amphibian richness recorded in this study is lower than that reported previously for the Quebrada de los Cuervos Protected Landscape Zone (24 species) (Prigioni et al., 2011). The presence of species from the Bufonidae family was not recorded at any of the sampling sites. Previous studies indicate the presence of species such as *Rhinella dorbignyi*; *R. achavali*; and *Melanophryniscus sanmartini* in the area (Prigioni et al., 2011). The lack of records is likely due to the explosive breeding dynamics (associated with heavy rainfall) and the short larval period typically exhibited by these bufonids (Fernández, 1927; Maneyro & Carreira, 2012). Additionally, the species *R. achavali* is usually associated with lotic water bodies, and no lotic water bodies were sampled in this study. The same could have occurred with the species *Limnomedusa macroglossa*, which reproduces in streams and brooks in rocky environments (Maneyro & Carreira, 2012). Another species, *Pleurodema bibroni*, which was not recorded in this study, has a record for the area but from the year 1926 (Prigioni et al., 2011).

Table 2. Anuran species present at the sampling sites and recording methods by site. References: Ch1NF; Ch2NF, and Ch3NF correspond to the ponds at the control site within the boundaries of the protected area; Ch1FA and Ch2FB are the ponds within the recently harvested site; Ch1FB and Ch1FB are the ponds present in the active afforestation. A = auditive recording; L = presence of tadpoles; V = visual recording. The asterisk (*) indicates that the species cannot be distinguished from other sympatric taxa through auditory recording

Family/Species	Sampling sites	Recording method
Family Hylidae		
<i>Dendropsophus sanborni</i> (Schmidt, 1944)	Ch1NF	A
	Ch1FB	A/V
	Ch2FB	A
<i>Dendropsophus minutus</i> (Peters, 1872)	Ch1NF	A/L/V
	Ch2NF	A
	Ch3NF	A
	Ch1FA	A
	Ch2FA	A/L
	Ch2FB	A/L/V
<i>Boana pulchella</i> (Duméril and Bibron, 1841)	Ch1NF	A/L/V
	Ch2NF	A
	Ch1FA	A/L/V
	Ch2FA	A/L/V
	Ch1FB	A/L/V
<i>Phyllomedusa iheringii</i> Boulenger, 1885	Ch2FB	A/L/V
	Ch1NF	A/L/V
<i>Pseudis minuta</i> Günther, 1858	Ch1NF	A/L/V
	Ch2NF	A
	Ch3NF	A/V
	Ch1FA	A
	Ch2FA	A
	Ch1FB	L/V
	Ch2FB	A/L/V
	Ch1NF	A/L/V
	Ch2NF	A
	Ch3NF	A

<i>Scinax granulatus</i> (Peters, 1871)	Ch1FA	A/L/V
	Ch2FA	A/L/V
	Ch1FB	L/V
	Ch2FB	A/V
<i>Scinax squalirostris</i> (Lutz, 1925)	Ch1NF	A/L/V
	Ch2NF	A/L/V
	Ch3NF	A/L/V
	Ch1FA	A
	Ch2FA	A/L/V
	Ch1FB	A/L/V
	Ch2FB	A/L/V
<i>Julianus uruguayus</i> (Schmidt, 1944)	Ch1FA	A/L/V
	Ch2FA	A
	Ch1FB	A
	Ch2FB	V
Family Leptodactylidae		
<i>Leptodactylus gracilis</i> (Duméril and Bibron, 1841)	Ch1NF	A/V
	Ch2NF	A/V
	Ch3NF	A/V
	Ch1FA	A/V
	Ch2FA	A
	Ch1FB	A
<i>Leptodactylus latinasus</i> Jiménez de la Espada, 1875	Ch2NF	A/V
	Ch1FA	A
	Ch1FB	A
<i>Leptodactylus luctator</i> (Hudson, 1892)	Ch1NF	A/V
	Ch2NF	A/L/V
	Ch3NF	L/V
	Ch1FA	L/V
	Ch2FA	A/L/V
	Ch2FB	A/L/V
<i>Leptodactylus mystacinus</i> (Burmeister, 1861)	Ch1NF	A
	Ch2NF	A/V
	Ch3NF	A
	Ch1FA	V
	Ch2FA	A
	Ch1FB	A
	Ch1NF	A*/

<i>Physalaemus biligonigerus</i> (Cope, 1861)	Ch2NF	A*/
	Ch3NF	A*/
	Ch2FA	A*/V
	Ch1FB	A*/
	Ch2FB	A*/L/V
<i>Physalaemus gracilis</i> (Boulenger, 1883)	Ch1NF	A*/
	Ch2NF	A*/L/V
	Ch3NF	A*/
	Ch2FA	A*/
	Ch1FB	A*/L/V
	Ch2FB	A*/V
<i>Pseudopaludicola falcipes</i> (Hensel, 1867)	Ch1NF	V
	Ch1FA	L/V
	Ch1FB	L/V
	Ch2FB	L/V
Family Microhylidae		
<i>Elachistocleis bicolor</i> (Guérin-Méneville, 1838)	Ch1FA	A
	Ch2FA	A
	Ch2FB	V
Family Odontophrynidae		
<i>Odontophrynus asper</i> (Philippi, 1902)	Ch1NF	L/V
	Ch1FA	L/V
	Ch1FB	L/V

It has been reported that anurans use water bodies in pine plantations, even for reproductive activity, but with lower richness and abundance compared to ponds located in natural grasslands (Machado et al., 2012). However, no significant differences were found in the total species richness ($H=1.65$; $p=0.50$) (Figure 5), nor in the composition of anuran species among the three study sites ($F=1.04$; $p=0.39$). There were also no differences observed in the number of species among the sites, considering the different sampling seasons ($\chi^2=1.14$; $p=0.35$). The complementarity index showed that the species composition between FA and FB was more similar ($C=6.25\%$); compared to each of these sites and the control ($CNF/FA=27.7\%$; $CNF/FB=22.2\%$). The only species detected during the study at the control site and not recorded for any of the forest sites was *Phyllomedusa iheringii* (Figure 6). Although this species has been observed in Eucalyptus plantations (Maneyro *obs. pers.*), we consider pine plantations, due to the characteristics of these trees, to be less suitable sites for the species. As mentioned earlier, *P. iheringii* is particularly associated with forest ecosystems, and due to this habitat specialization, it may

be affected by the loss of these environments due to afforestation (Langone et al., 2004), which could explain its absence in both forest sites. The loss of habitat specialist species and the high persistence capacity of generalist species have been reported in other amphibian communities in agricultural areas (Saccol et al., 2017; 2022). The results highlight the importance of amphibians as bioindicators of environmental quality and the need to develop conservation or management plans for *P. iheringii* populations that may be present in areas destined for pine afforestation.

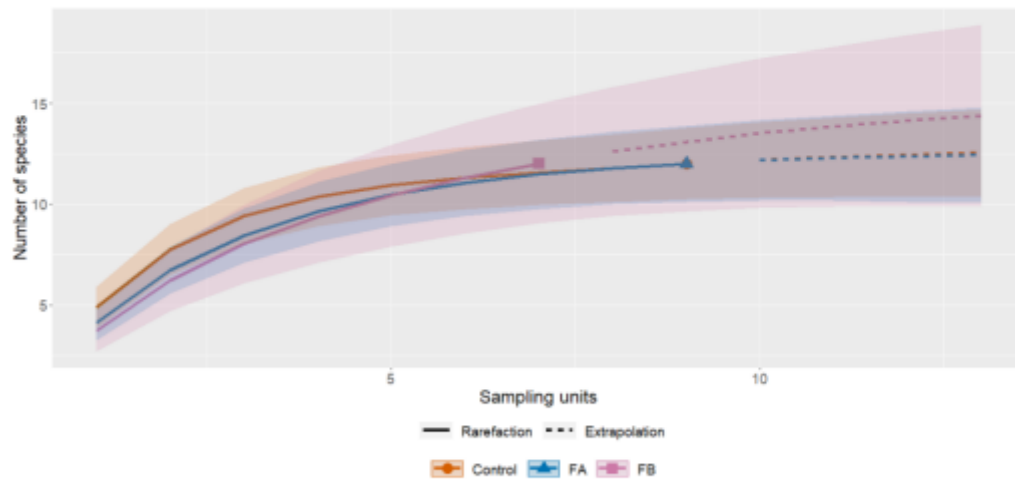


Figure 5. Comparison of amphibian species richness in two sites affected by afforestation and a control site, located in the department of Treinta y Tres, Uruguay, using rarefaction. References: Control (orange circle) - control site within the PPQC and SY; FA (blue triangle) - recently harvested *Pinus taeda* plantation; FB (pink square) -active *P. taeda* plantation.



Figure 6. Specimen of *Phyllomedusa iheringii* (Anura, Hylidae), in its natural environment. Photo: Ernesto Elgue.

Most of the anuran species recorded in this study are generalists, with no specific habitat requirements, and many can inhabit anthropized environments as well as agroecosystems (e.g., forest plantations, rice fields, soybean crops) (Peltzer et al., 2006; Moreira et al., 2014; Saccol et al., 2017; Attademo et al., 2018), which could explain the similarity in species richness and composition of assemblages between the control site and the forest sites. Another possible explanation could be related to the characteristics of the sampling sites. According to Dalmolin et al. (2022), local environmental descriptors such as climatic factors and characteristics of water bodies (e.g., pond area, water depth, dissolved oxygen) influence the diversity of anuran larvae. In the present study, we did not find significant differences in most of the physicochemical water variables analyzed between the sampling ponds, and furthermore, soil characteristics (% OM and pH) were very similar among these sites; which could explain the results obtained at the level of anuran assemblage diversity between the sites. Although we found higher concentrations of nitrates and phosphates in water bodies at the Forest site FA, which is common in agroecosystems (e.g., Babini et al., 2016), it is worth

noting that these nutrients were found in low concentrations, considerably below the maximum limits established for the sustainability of aquatic life (USEPA, 1997; Burton & Pitt, 2001). In future studies, it would be interesting to analyze the landscapes surrounding the different sampling sites and observe their degree of disturbance since, if these landscapes are well conserved, they could offer favorable conditions for the maintenance of populations at the local level and thus homogenize the species composition at a regional scale (Dos Santos et al., 2021).

Body condition index and alterations in blood parameters in individuals of *Pseudis minuta*

Table 3 shows the total number of *Pseudis minuta* individuals captured per site and per field trip, as well as the mean values of SVL in mm and mass in g. The effects of afforestation were also not evident on the BCI of adult *Pseudis minuta* individuals, as no significant differences were found in the body condition of *P. minuta* individuals among the three study sites ($H=1.65$; $p=0.50$). A recent study comparing the body condition of seven anuran species in Uruguay, between pine and eucalyptus forest plantations and natural ecosystems (grassland and riparian forest), only found differences for one species, *Leptodactylus luctator* (Maneyro & Carreira, 2023). Considering this aspect, it would be advisable to extend the analysis to other anuran species that make up the assemblages present in the study sites, as well as to increase the sample size in order to detect more subtle statistical differences in the body condition of individuals.

Table 3. Mean values of SVL (mm) and M (g) of *P. minuta* individuals collected per site in each sampling event

Sampling sites	Sampling month	n	SVL mm $\pm$ SD (min-max)	M g $\pm$ SD (min-max)
Control (Ch1NF+Ch2NF+Ch3NF)	Feb-19	16	38.44 $\pm$ 6.24 (27.66-48.74)	6.91 $\pm$ 3.08 (2.6-12.1)
FA (Ch1FA+Ch2FA)	Feb-19	11	38.83 $\pm$ 1.46 (32.64-48.63)	7.8 $\pm$ 3.34 (4.5-16.1)
FB (Ch1FB+Ch2FB)	Feb-19	13	39.22 $\pm$ 6.13 (30.88-49.35)	8.24 $\pm$ 3.94 (3.2-16.1)
Control (Ch1NF+Ch2NF+Ch3NF)	Sep-19	15	36.33 $\pm$ 4.85 (25.27-43.54)	6.54 $\pm$ 2.42 (3.4-12)

FA (Ch1FA+Ch2FA)	Sep-19	14	37.70±3.52 (33.1-43.67)	7.67±2.48 (4.9-12)
FB (Ch1FB+Ch2FB)	Sep-19	16	36.49±3.35 (29.36-41)	5.63±1.47 (3.1-7.5)
Control (Ch1NF+Ch2NF+Ch3NF)	Nov-19	20	36.56±5.02 (28.77-47.48)	6.61±2.89 (2.9-15)
FA (Ch1FA+Ch2FA)	Nov-19	5	35.94±7.62 (25.73-45.77)	7.88±5.09 (2.5-15)
FB (Ch1FB+Ch2FB)	Nov-19	23	33.76±5.45 (26.31-47.01)	5.64±3.28 (2.7-16)

The presence of micronucleated erythrocytes and nuclei with notches was detected in tadpoles of *P. minuta* from the pond located in the active Pine plantation (site FB). The frequency of MN+ENA in these tadpoles was significantly higher than in tadpoles from the control site ($Z=-1.88$; $p<0.05$) (Figure 7), demonstrating the cellular-level effects of forestry activity. The presence of aberrant nuclei complements the analysis of MN in genotoxicity assessments (Cavas & Ergene-Gözükar, 2005); and the induction of both types of erythrocyte alterations together can cause cellular damage and death (Barni et al., 2007). The only nuclear aberration observed in the erythrocytes of *P. minuta* tadpoles was notched nuclei, an anomaly mainly associated with cytotoxicity (Bolgnesi et al., 2006). These results would indicate the presence of geno-cytotoxic agents in the pond of the forestry site. In general, forestry activity involves the use of agrochemicals restricted to the early stages of cultivation, although often management may require reapplications at later stages. At the time of the study, the plantation was nine years old; however, as we are unaware of its management history, we cannot rule out the residual effect of any of the agrochemicals (or their metabolites) that may have been used in the field; as well as the fact that chemical contaminants may reach the site through runoff from other agricultural sites. In this regard, it is worth mentioning that, although natural environments surround the study forestry, we identified two *Eucalyptus* sp. forestry plantations, one located 2.7 km to the South and another 3.5 km to the North. The latter forestry is more recent and located at the head of the basin, upstream, which would favour water runoff towards the study forestry.

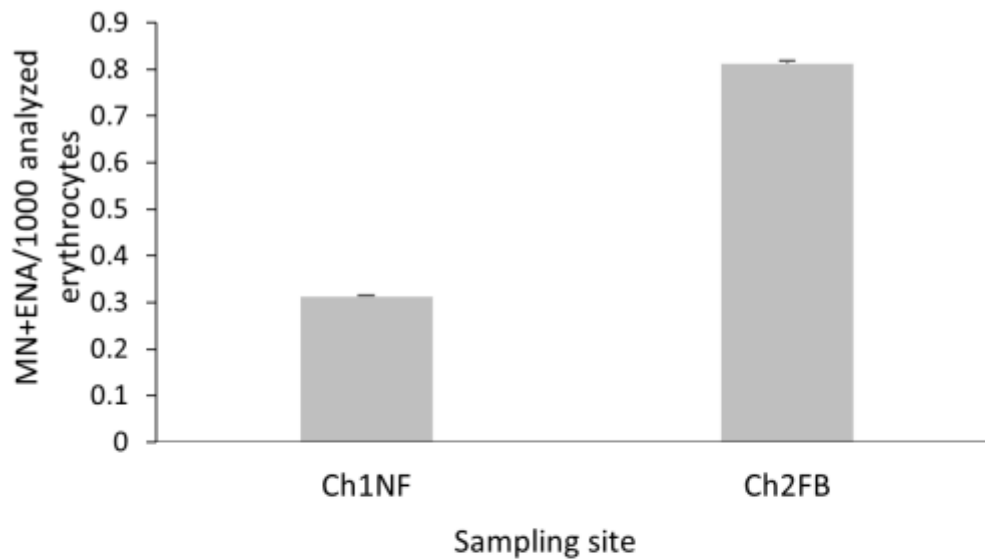


Figure 7. Frequency of micronuclei and nuclear abnormalities (MN+NA) (per 1000 cells) in tadpoles of *P. minuta*; from the control site and a forest site. References: Ch1NF: pond present in the control site within the PPQC and SY; Ch2FB: pond present in the active *Pinus taeda* forest.

Final Considerations

Finally, it is worth noting that most studies focus on assessing the effects of agricultural and forestry activities on amphibian assemblages (e.g., Machado et al. 2012; Saccol et al., 2017; Gangenova et al., 2018). The similarity in amphibian species richness between different types of habitat alteration (e.g., forestry, agriculture, urban areas) and natural sites has been reported in previous studies (e.g., Decena et al. 2020; Dos Santos et al., 2021). Recently, Schvezov et al. (2023) demonstrated that changes in soil chemistry caused by pine plantations in Argentina (e.g., alterations in organic matter percentage, organic carbon, and total nitrogen) affect the growth, development, and oxidative stress in tadpoles of two frog species. Considering the above and the preliminary results obtained in this chapter, we highlight the importance of conducting further studies to evaluate the potential effects of pine forestry activity on amphibians at other scales (e.g., at the population, cellular, and physiological levels), including the use of other biomarkers such as enzymatic oxidative stress indicators.

References

- Ayres, M., Júnior Aires, M., Ayres, D. L., & Santos, A. D. A. S. (2007). Bio Estat 5.0: aplicações estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas. In *Bio Estat 5.0: aplicações estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas* (pp. 364-364).
- Afonso, L. G., & Eterovick, P. C. (2007). Spatial and temporal distribution of breeding anurans in streams in southeastern Brazil. *Journal of Natural History*, 41(13-16), 949–963.
- Allingham, S. M. (2020). The effects of habitat alteration on anuran diversity and assemblages on Mount Mulanje, Malawi. *African Journal of Wildlife Research*, 50(1), 20–35.
- Attademo, A. M., Lorenzón, R. E., Peltzer, P., & Lajmanovich, R. C. (2018). Diversity of anurans in rice fields under organic and conventional management in Santa Fe province, Argentina. *Herpetological Review*, 49(4), 632–635.
- Babini, M. S., de Lourdes Bionda, C., 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 118–125.
- Babini, M. S., Bionda, C. D. L., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2016). Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188, 1–14.
- Baeza, S., & Paruelo, J. M. (2020). Land use/land cover change (2000–2014) in the Rio de la Plata grasslands: an analysis based on MODIS NDVI time series. *Remote sensing*, 12(3), 381.
- Băncilă, R. I., Hartel, T., Plăiașu, R., Smets, J., & Cogălniceanu, D. (2010). Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amphibia-Reptilia*, 31(4), 558–562.
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., & Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 45–54.
- Bastazini, C. V., Munduruca, J. F., Rocha, P. L. B., & Napoli, M. F. (2007). Which environmental variables better explain changes in anuran community composition? A case study in the restinga of Mata de São João, Bahia, Brazil. *Herpetologica*, 63(4), 459–471.

- Becker, C. G., Fonseca, C. R., Haddad, C. F. B., Batista, R. F., & Prado, P. I. (2007). Habitat split and the global decline of amphibians. *Science*, 318(5857), 1775–1777.
- Benvindo-Souza, M., Oliveira, E. A. S., Assis, R. A., Santos, C. G. A., Borges, R. E., e Silva, D. D. M., & de Souza Santos, L. R. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240, 124910.
- Berazategui, M., Camargo, A., & Maneyro, R. (2007). Environmental and seasonal variation in the diet of *Elachistocleis bicolor* (Guérin-Méneville 1838) (Anura: Microhylidae) from northern Uruguay. *Zoological Science*, 24(3), 225–231.
- Bionda, C. D. L., Babini, S., Martino, A. L., Salas, N. E., & Lajmanovich, R. C. (2018). Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad *Rhinella arenarum* (anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation*, 14, e00398.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., & Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic toxicology*, 78, S93–S98. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.015>.
- Borcard, D., Gillet, F., & Legendre, P. (2011). *Numerical ecology with R* (Vol. 2, 688p.). New York: Springer.
- Burton Jr, G. A., & Pitt, R. (2001). *Stormwater effects handbook: A toolbox for watershed managers, scientists, and engineers*. CRC Press.
- Bustamante, R. O., & Simonetti, J. A. (2005). Is *Pinus radiata* invading the native vegetation in central Chile? Demographic responses in a fragmented forest. *Biological Invasions*, 7, 243–249.
- Caldwell, J. P., & Shepard, D. B. (2007). Calling site fidelity and call structure of a Neotropical toad, *Rhinella ocellata* (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 41(4), 611–621.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123–2136.
- Carreira, S., & Maneyro, R. (2015). *Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay: Una Evaluación del Estado de Conservación de la Herpetofauna de Uruguay sobre la Base de los Criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza*. MVOTMA, Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, Dirección Nacional de Medio Ambiente.

- Carreira, S., & Maneyro, R. (Eds.). (2019). *Libro rojo de los anfibios y reptiles del Uruguay: biología y conservación de los anfibios y reptiles en peligro de extinción a nivel nacional*. MVOTMA, Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA, Dirección Nacional de Medio Ambiente.
- Çavaş, T., & Ergene-Gözükara, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology*, 74(3), 264–271.
- Cayuela, H., Lambrey, J., Vacher, J. P., & Miaud, C. (2015). Highlighting the effects of land-use change on a threatened amphibian in a human-dominated landscape. *Population Ecology*, 57, 433–443.
- Chao, A., & Jost, L. (2012). Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*, 93(12), 2533–2547.
- Collins, J. P., Crump, M. L., & Lovejoy III, T. E. (2009). *Extinction in our times: global amphibian decline*. Oxford University Press.
- Colwell, R. K., & Coddington, J. A. (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 345(1311), 101–118.
- Cushman, S. A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological Conservation*, 128(2), 231–240.
- Dalmolin, D. A., dos Santos, T. G., Tozetti, A. M., & Pereira, M. J. R. (2022). Environmental descriptors and reproductive modes drive multiple facets of tadpole diversity in subtropical temporary ponds. *Aquatic Ecology*, 56(4), 951–971.
- Decena, S. C. P., Avorque, C. A., Decena, I. C. P., Asis, P. D., & Pacle, B. (2020). Impact of habitat alteration on amphibian diversity and species composition in a lowland tropical rainforest in Northeastern Leyte, Philippines. *Scientific Reports*, 10(1), 10547.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de transferencia InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dos Santos, R. C., Dalmolin, D. A., Brum, D., Veronez, M. R., Lucas, E. M., & Tozetti, A. M. (2021). Association between land use and composition of amphibian species in temperate Brazilian forest remnants. *Herpetological Conservation and Biology*, 16(3), 612–623.
- Eterovick, P. C., Sloss, B. L., Scalzo, J. A., & Alford, R. A. (2016). Isolated frogs in a crowded world: Effects of human-caused habitat loss on frog heterozygosity and fluctuating asymmetry. *Biological Conservation*, 195, 52–59.

- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 81–95.
- Fernández, K. (1927). Sobre la biología y reproducción de batracios argentinos. Segunda parte. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba*, 29, 271–328.
- Figueiredo, G. D. T., Storti, L. F., Lourenco-De-Moraes, R., Shibatta, O. A., & ANJOS, L. (2019). Influence of microhabitat on the richness of anuran species: a case study of different landscapes in the Atlantic Forest of southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(2), e20171023.
- Fonseca, C. R., Ganade, G., Baldissera, R., Becker, C. G., Boelter, C. R., Brescovit, A. D., ... & Vieira, E. M. (2009). Towards an ecologically-sustainable forestry in the Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 142(6), 1209–1219.
- Gangenova, E., Zurita, G. A., & Marangoni, F. (2018). Changes to anuran diversity following forest replacement by tree plantations in the southern Atlantic forest of Argentina. *Forest Ecology and Management*, 424, 529–535.
- 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.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 1–9.
- Heyer, R., Donnelly, M. A., Foster, M., & McDiarmid, R. (Eds.). (2014). *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution.
- Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2016). iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution*, 7(12), 1451–1456.
- INIA. (2022). Estación, Banco de datos agroclimáticos 1965–2018. Estación Treinta y Tres, Uruguay. <http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico>. (Accessed May 2023).
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2023). *Pseudis minuta*. The IUCN Red List of Threatened Species 2023: e.T55903A101426270. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T55903A101426270.en>. (Accessed 08 April 2024).
- IUCN. (2023). *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>.

- Jackson, R. B., Banner, J. L., Jobbágy, E. G., Pockman, W. T., & Wall, D. H. (2002). Ecosystem carbon loss with woody plant invasion of grasslands. *Nature*, 418(6898), 623–626.
- Jobbágy, E. G., Vasallo, M., Farley, K. A., Pineiro, G., Garbulsky, M. F., Nosetto, M. D., ... & Paruelo, J. M. (2006). Forestación en pastizales: hacia una visión integral de sus oportunidades y costos ecológicos. *Agrociencia Uruguay*, 10(2), 109–124.
- Keller, A., Rödel, M. O., Linsenmair, K. E., & Grafe, T. U. (2009). The importance of environmental heterogeneity for species diversity and assemblage structure in Bornean stream frogs. *Journal of Animal Ecology*, 78(2), 305–314.
- Kellermann, A. G., Scalón-Luchese, M., Vieira, R. C., Brack, I. V., & Verrastro, L. (2021). Local extinction of *Tropidurus catalanensis* caused by plantation forestry in the Pampas of Brazil. *Herpetological Conservation and Biology*, 16(2), 295–302.
- Knapp, S. M., Haas, C. A., Harpole, D. N., & Kirkpatrick, R. L. (2003). Initial effects of clearcutting and alternative silvicultural practices on terrestrial salamander abundance. *Conservation Biology*, 17(3), 752–762.
- Kwet, A., Lavilla, E., Faivovich, J., & Langone, J. (2004). *Pseudis minuta*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55903A11385301. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55903A11385301.en>. (Accessed 17 Nov 2023).
- Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Bassó, A., & Lorenzatti, E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 7–12.
- Langone, J. A., Maneyro, R., & Arrieta, D. (2004). Present knowledge of the status of amphibian conservation in Uruguay. *Collected DAPTF Working Group Reports: Ten Years On. Department of Biological Sciences, The Open University, Walton Hall*, 83–87.
- Le Maitre, D. C., Versfeld, D. B., & Chapman, R. A. (2000). Impact of invading alien plants on surface water resources in South Africa: A preliminary assessment. *Water SA*, 26(3), 397–408.
- Machado, I. F., Moreira, L. F., & Maltchik, L. (2012). Effects of pine invasion on anurans assemblage in southern Brazil coastal ponds. *Amphibia-Reptilia*, 33(2), 227–237.
- Magurran, A. E., & McGill, B. J. (2011). *Biological Diversity*. Oxford University Press, New York.

- Maneyro, R., & Carreira, S. (2012). *Guía de anfibios del Uruguay*. Ediciones de la fuga. (207 p.) Colección Ciencia Amiga Press, Uy.
- Maneyro, R., J. Langone & S. Carreira. 2019. Anfibios. En: Carreira, S. & R. Maneyro (Eds.): Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles del Uruguay. Biología y conservación de los Anfibios y Reptiles en peligro de extinción a nivel nacional. (17–106 pp). Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo.
- Maneyro, R. & S. Carreira. (2023). Respuesta de un ensamble de anfibios a la actividad forestal. En: Brazeiro, A (Ed.). Biodiversidad en paisajes forestados de Uruguay. (67–86 pp.) *Comisión Sectorial de Investigación Científica (UdelaR), Uruguay*.
- Margolin, B. H., Collings, B. J., & Mason, J. M. (1983). Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments with binomial responses. *Environmental Mutagenesis*, 5(5), 705–716.
- Means, D. B., Palis, J. G., & Baggett, M. (1996). Effects of slash pine silviculture on a Florida population of flatwoods salamander. *Conservation Biology*, 10(2), 426–437.
- Meintières, S., Biola, A., Pallardy, M., & Marzin, D. (2001). Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. *Mutagenesis*, 16(3), 243–250.
- Metcalf, J. L. (1989). Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environmental Pollution*, 60(1-2), 101–139.
- MGAP-DGF. (2021). Cartografía Nacional Forestal 2021. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección General Forestal. Montevideo, Uruguay. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/resultados-cartografia-forestal-2021>. (Accessed May 2022).
- Moreno, C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. (84 p.) Zaragoza: M&T-Sociedad Entomológica Aragonesa.
- Moreira, L. F. B., Knauth, D. S., & Maltchik, L. (2014). Checklist of amphibians in a rice paddy area in the Uruguayan savanna, southern Brazil. *Check List*, 10(5), 1014–1019.
- Moulton, C. A. (1996). The use of PVC pipes to capture hylid frogs. *Herpetological Review*, 27, 186–187.
- Nosetto, M. D., Jobbágy, E. G., & Paruelo, J. M. (2005). Land-use change and water losses: the case of grassland afforestation across a soil textural gradient in central Argentina. *Global Change Biology*, 11(7), 1101–1117.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., ... & Imports, M. A. S. S. (2019). Package ‘vegan’. *Community ecology package, version*, 2(9).
- Panario, D., & Gutiérrez, O. (2007). La política forestal industrial del estado uruguayo. *Seminario: Política y Pasteras en el Río Uruguay: Medio*

- Ambiente, Modelos Productivos y Movimiento Social* (1–9 p.). UNSAM, Argentina
- Parris, K. M., & Lindenmayer, D. B. (2004). Evidence that creation of a *Pinus radiata* plantation in south-eastern Australia has reduced habitat for frogs. *Acta Oecologica*, 25(1–2), 93–101.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., & Beltzer, A. H. (2006). Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. *Marine, Freshwater, and Wetlands Biodiversity Conservation*, 15, 3499–3513.
- Prigioni, C., Borteiro, C., & Kolenc, F. (2011). Amphibia and Reptilia, Quebrada de los Cuervos, Departamento de Treinta y Tres, Uruguay. *Check List*, 7(6), 763–767.
- Proyecto MapBiomias Pampa Trinacional. (2023). Colección 2.0 de los Mapas Anuales de Cobertura y Uso del Suelo en Pampa Trinacional. <https://pampa.mapbiomas.org/>. (Accessed 25 Oct 2023).
- R Core Team. (2022). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. (Accessed 20 June 2023).
- Richardson, D. M., Williams, P. A., & Hobbs, R. J. (1994). Pine invasions in the Southern Hemisphere: determinants of spread and invadability. *Journal of Biogeography*, 21(5), 511–527.
- Saccol, S. D. S. A., Bolzan, A. M. R., & Gomes dos Santos, T. (2017). In the shadow of trees: Does eucalyptus afforestation reduce herpetofaunal diversity in Southern Brazil?. *South American Journal of Herpetology*, 12(1), 42–56.
- Saccol, S. D. S. A., Cavalheiro Dias Ucha, J. L., Madalozzo, B., Zanini Cechin, S., & Gomes dos Santos, T. (2022). Influence of land use on the diversity of pond-breeding anurans in South Brazilian grasslands. *Biodiversity and Conservation*, 31, 21–37.
- Schvezov, N., Caffetti, J., Silva, C., Boeris, J., Baldo, D., & Lajmanovich, R. (2023). Impact of soil from monoculture pine plantations on two anuran species from the Atlantic Forest: *Odontophrynus reigi* and *Leptodactylus luctator*. *Science of The Total Environment*, 869, 161769.
- Silva, F. R., Oliveira, T. A., Gibbs, J. P., & Rossa-Feres, D. C. (2012). An experimental assessment of landscape configuration effects on frog and toad abundance and diversity in tropical agro-savannah landscapes of southeastern Brazil. *Landscape Ecology*, 27, 87–96.
- Smith, M. A., & Green, D. M. (2005). Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations?. *Ecography*, 28(1), 110–128.
- SNAP. (2010). Plan de Manejo Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos. Proyecto Fortalecimiento del Proceso de Implementación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (URU/05/001). <https://www.gub.uy/ministerio->

- ambiente/comunicacion/publicaciones/plan-manejo-paisaje-protégido-quebrada-cuervos-sierras-del-yerbal. (Accessed May 2022).
- Stebbins, R. C., & Cohen, N. W. (1995). *A Natural history of amphibians*. Princeton University Press.
- USEPA. (1997). Volunteer Stream Monitoring: A Methods Manual. EPA 841-B-97-003. Office of Water 4503F, Washington. (227 pp.) <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/stream.pdf>.
- Veldman, J. W., Overbeck, G. E., Negreiros, D., Mahy, G., Le Stradic, S., Fernandes, G. W., ... & Bond, W. J. (2015). Tyranny of trees in grassy biomes. *Science*, 347(6221), 484–485.
- Wells, K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press.
- Zalba, S. M., Cuevas, Y. A., & Devillalobos, A. E. (2009). Lecciones aprendidas durante siete años de control de pinos invasores en pastizales naturales. En: Cazzaniga, N.J. & Arelovich, H.M. (eds.). *Ambientes y recursos naturales del sudoeste bonaerense: producción, contaminación y conservación*. (325–340pp.). Editorial de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

ANEXO II

Limnetica, 43(2): 287-302 (2024). DOI: 10.23818/limn.43.19
© Asociación Ibérica de Limnología, Madrid, Spain. ISSN: 0213-8409



Acute toxicity and genotoxicity of the S-metolachlor-based herbicide Dual Gold® on *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892) tadpoles (Anura: Leptodactylidae).

Gisela Pereira ^{a,*}, Mariabelén Riero ^a , Rafael C. Lajmanovich ^{b,c} and Raúl Maneyro ^a

^a Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados-Herpetología, Instituto de Ecología y Ciencias ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay.

^b Laboratorio de Ecotoxicología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje el Pozo s/n (3000), Santa Fe, Argentina.

^c Consejo Nacional de Investigaciones Científicas Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

* Corresponding author: gpereira@fcien.edu.uy

Received: 23/03/23

Accepted: 25/07/23

ABSTRACT

Acute toxicity and genotoxicity of the S-metolachlor-based herbicide Dual Gold® on *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892) tadpoles (Anura: Leptodactylidae).

Herbicides used in agriculture and their metabolites are frequently detected in surface water bodies, where they can persist and cause adverse effects on aquatic organisms. The aim of this study was to evaluate the acute toxicity and genotoxic effects of the S-metolachlor (SM)-based herbicide Dual Gold® (DG®), on *Leptodactylus luctator* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). To assess the toxicity of the herbicide, including the median lethal concentration (LC50) at 24h, the no-observed-effect concentration (NOEC), and the lowest-observed-effect concentration (LOEC), tadpoles were exposed to five nominal concentrations of DG® (5.0, 6.2, 7.8, 9.8, and 12.2 mg/L), and to dechlorinated water as a negative control (NC). The LC50_{24h} of DG® was 7.0 mg/L, the NOEC was 5.0 mg/L and the LOEC=6.2 mg/L. *L. luctator* tadpoles were sensitive to the herbicide, reaching 100% mortality after 24 h of exposure to the highest concentration tested (12.2 mg/L). To evaluate the potential genotoxicity of the herbicide, the frequencies of micronuclei (MN) and other erythrocyte nuclear abnormalities (ENA) were determined in larvae exposed to three nominal concentrations of DG® (1.0, 5.0, and 6.2 mg/L) for 48 and 96 h. The frequencies of MN and ENA were compared with a positive control (40 mg/L of Cyclophosphamide) and a negative control. The frequencies of MN and ENA in the erythrocytes of tadpoles exposed to the test concentrations of DG® and Cyclophosphamide were significantly higher than in the negative control group at both 48 and 96 h (with the only exception of MN at 1.0 mg/L at 48 h). Our results confirm the genotoxic and cytotoxic effects of this widely used herbicide in agriculture, a fact that represents a potential risk to amphibians that develop in ponds associated with or immersed in agroecosystems.

KEYWORDS: agrochemicals; lethality; micronuclei; erythrocyte nuclear abnormalities; commercial formulation; active ingredient; amphibians.

RESUMEN

Toxicidad aguda y genotoxicidad del herbicida Dual Gold®, a base de S-metolaclo-ro sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892) (Anura: Leptodactylidae).

Los herbicidas utilizados en agricultura y sus metabolitos, son frecuentemente detectados en cuerpos de agua superficiales, donde pueden persistir y provocar efectos adversos a organismos acuáticos. Evaluamos la toxicidad aguda y geno-

toxicidad del herbicida Dual Gold® (DG®), a base de S-metolachloro (SM), sobre larvas de *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae). Para determinar la toxicidad del herbicida, incluída la concentración letal media (CL50) 24h, la concentración sin efecto observado (NOEC); y con efecto observado más baja (LOEC); las larvas fueron expuestas a cinco concentraciones nominales de DG® (5.0; 6.2; 7.8; 9.8; y 12.2 mg/L); y a un control negativo con agua dechlorada. El valor de CL50_{24h} para DG® fue de 7.0 mg/L (NOEC=5.0 mg/L; LOEC=6.2 mg/L). Las larvas fueron sensibles al herbicida, alcanzando el 100% de mortalidad a las 24h, en la concentración más alta testada (12.2 mg/L). Para estudiar el potencial genotóxico del herbicida, se determinó la frecuencia de micronúcleos (MN) y de otras aberraciones nucleares de los eritrocitos (ENA), en larvas expuestas a tres concentraciones de DG® (1.0, 5.0 y 6.2 mg/L), durante 48 y 96h; y las mismas se compararon con un control positivo (40 mg/L de Ciclofosfamida) y negativo. Las frecuencias de MN y ENA en los eritrocitos de larvas expuestas a las concentraciones de prueba de DG® y Ciclofosfamida fueron significativamente mayores que en el grupo control negativo, a las 48 y 96 h (con la única excepción de MN a 1.0 mg/L a las 48 h). Nuestros resultados comprueban los efectos genotóxicos y citotóxicos de este herbicida ampliamente utilizado en la agricultura, lo cual representa un riesgo potencial para los anfibios que se desarrollan en cuerpos de agua asociados o inmersos en agroecosistemas.

PALABRAS CLAVES: agroquímicos; letalidad; micronúcleos; anomalías nucleares de eritrocitos; formulación comercial; ingrediente activo, anfibios.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) License.

INTRODUCTION

One of the primary causes of the massive global decline observed in amphibian populations is the environmental pollution resulting from the increased use of agrochemicals (IUCN, 2022). Pesticides used in agriculture and their metabolites are frequently detected in surface water bodies (e.g., Gilliom et al., 2006; De Liguoro et al., 2014; Nardo et al., 2015), where they can persist and cause adverse effects on non-target aquatic organisms such as fish and amphibians (Zhelev et al., 2018). Anurans amphibians are particularly vulnerable to aquatic contamination since this environment is where the amplexus, oviposition, and initial (and most critical) stages of their life cycle, such as embryonic and larval development, occur (Wells, 2007). Additionally, anurans have a thin and permeable skin, which allows the entry of water-soluble substances, and a high bioaccumulation rate (Unrine et al., 2007). Due to their high sensitivity, they are frequently used as bioindicators of environmental health (e.g., Attademo et al., 2005; Peltzer et al., 2013; Eterovick et al., 2016; Saccol et al., 2017; Bionda et al., 2018).

The use of bioassays to evaluate the exposure to agrochemicals is a common experimental approach to obtain dose/response information in amphibians (Pérez-Iglesias et al., 2019; Freitas et al., 2019; Lajmanovich et al., 2022). To detect the

biological consequences of exposure, biomarkers of toxic effects (Lajmanovich et al., 2021), such as alterations in the morphology of blood cells and enzymatic activity (Attademo et al., 2014; Lajmanovich et al., 2014; Gripp et al., 2017), are used. One of the most prominent indicators of damage to genetic material is the presence of micronuclei (MN) in red blood cells (Lajmanovich et al., 2005). Another nuclear abnormality considered as an indicator of genotoxicity is the presence of erythrocyte nuclear abnormalities (ENA) (Carrasco et al., 1990). In amphibians, evaluations of genotoxicity through the recognition of these biomarkers, using techniques such as the Micronucleus Test (Schmidt, 1975), are increasing (Pollo et al., 2015; Pérez-Iglesias et al., 2015; Lajmanovich et al., 2018; Benvindo-Souza et al., 2020).

S-metolachlor (SM) (CAS 87392-12-9) is a selective herbicide belonging to the chloroacetamide group (Lewis et al., 2016; PAN Pesticide Database, 2022). It is absorbed by roots and shoots, and inhibits cell division and growth (Valotton et al., 2008; Lewis et al., 2016). SM has a high potential for bioaccumulation, is moderately mobile in the environment, has low volatility, and has moderate solubility in water and persistence in the soil (Lewis et al., 2016; Observatorio Ambiental Nacional, 2022), all of which increases the likelihood of runoff into surface water bodies.

SM is also considered an important contaminant of groundwater (PAN Pesticide Database, 2022). The effects of SM have been evaluated in fish (Quintaneiro et al., 2017; Liu et al., 2022), crabs (Velisek et al., 2019; Stara et al., 2019), crustaceans (Liu et al., 2006), and bivalve mollusks (Mai et al., 2013). In amphibians, studies on the toxic effects of Metolachlor have been conducted on *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) embryos (Osano et al., 2002) and *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) larvae (Wan et al., 2006), and endocrine alterations have also been evaluated in adult individuals of *Lithobates pipiens* and *L. clamitans* (McDaniel et al., 2008). Previous studies have also evaluated the chronic effects of SM on larvae of *Anaxyrus americanus* (Holbrook, 1836), *Pseudacris triseriata* (Wied-Neuwied, 1838), and *Dryophytes versicolor* (LeConte, 1825) (Williams et al., 2010), as well as its effects on *Pelophylax perezi* (López-Seoane, 1885) embryos (Quintaneiro et al., 2018). Paunescu et al. (2018) assessed the effects of the SM-based herbicide DG®, and reported different alterations, such as hepatic lesions, hyperglycemia, and a decrease in the number of erythrocytes, in *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) adults exposed to the herbicide. More recently, de Arcaute et al. (2020) studied the acute toxicity and the interactions between equitoxic and non-equitoxic mixtures of the herbicides Credit® (based on glyphosate) and Twin Pack Gold® (formulated with flurochloridone and SM) on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) tadpoles and found that the toxicity of the mixtures varied from being additive to being slightly antagonistic.

Given that, due to its higher herbicidal activity (Shaner et al., 2006), the S-isomer of Metolachlor is one of the most widely used compounds in agriculture worldwide (Atwood & Paisley-Jones, 2017), further studies are needed to evaluate its effects on amphibian tadpoles. In Uruguay, SM is mainly used in fallow crops such as soybean, eucalyptus, corn, sorghum, and peanuts. The quantity of imported SM active ingredient increased from 222 336 kg in 2014 to 538 369 kg in 2020. It is classified as a priority pesticide for environmental management (Observatorio Ambiental Nacional, 2022). Regionally, the presence of Metolachlor and SM has been detected in sediments,

as well as in surface and groundwater, in areas with agricultural activity (Andrade et al., 2021; Vera-Candioti et al., 2021; Lajmanovich et al., 2023; Van Opstal et al., 2023). Despite the central role of agricultural activity in the Pampas biome (Baeza et al., 2022), only one study evaluating the effect of herbicide mixtures, including a formulation with SM and another active ingredient, on regional amphibians is known (de Arcaute et al., 2020). However, there are no studies assessing the effects of commercial formulations based solely on SM on Pampean amphibians.

Thus, the aim of this study was to evaluate the lethality and genotoxic effects of the SM-based herbicide DG® on *Leptodactylus luctator* tadpoles (Anura: Leptodactylidae), using acute toxicity bioassays. Our specific objectives were to determine the mean lethal concentration ($LC_{50_{24h}}$) of DG® on *L. luctator* tadpoles and to evaluate the frequency of MN and ENA in peripheral blood erythrocytes of *L. luctator* tadpoles.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The commercial formulation of the herbicide Dual Gold® 960 EC (DG®) (87.3% S-metolachlor ((S)-2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl) acetamide, CAS# 87392-12-9), marketed by Syngenta Uruguay S.A., was used. Cyclophosphamide (CP) (ENDOXAN, 50 mg from the Baxter laboratory in Germany) was used as a positive control. The test concentrations reported throughout the study represent the nominal concentrations of the active ingredient SM contained in the commercial formulation (DG®).

Test organisms

Leptodactylus luctator (Anura: Leptodactylidae) has a wide distribution in the southern cone of South America (Magalhaes et al., 2020). It has a broad habitat use and can be found in natural field areas as well as in environments affected by agricultural and forestry activities (Maneyro & Carreira, 2012). It is considered a very common species and is not listed as threatened in regional

red lists (e.g., Carreira & Maneyro, 2015) or at a global scale (Heyer *et al.*, 2010). Several previous toxicological studies have used this species as a test organism (Araujo *et al.*, 2014; Josende *et al.*, 2015; Lajmanovich *et al.*, 2015; Bach *et al.*, 2016; 2018; Samojeden *et al.*, 2022).

Collection and maintenance of *Leptodactylus luctator* tadpoles

Tadpoles were manually collected from a site without agricultural activities located in Melilla, Montevideo, Uruguay. They were then transported to an animal facility located in the “Facultad de Ciencias, de la Universidad de la República”, Montevideo, with water from the collection site. The tadpoles ($n=300$) were collected with the permission of the “Dirección Nacional de Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos” (code EM2022/36001/003604), of the “Ministerio de Ambiente” (Montevideo, Uruguay). Their average body length was 9.7 ± 0.7 (8.4–11.5) mm and their weight was 0.13 ± 0.02 (0.09–0.18) g, and they were in stage GS 25–28 (Gosner, 1960). Tadpoles were acclimated for 48 h in 20-L aquaria containing previously filtered (PSA filter, senior 3 model) and dechlorinated tap water ($\text{pH}=7.6\pm0.4$; conductivity= 374 ± 22 $\mu\text{S/s}$; dissolved oxygen= 8.4 ± 0.9 mg/L; temperature= 19 ± 1.3 °C), with constant artificial aeration, a 12:12 hour light/dark photoperiod, and an ambient temperature of 22 ± 2 °C. They were fed *ad libitum* with boiled lettuce (*Lactuca sativa*) until the beginning of the bioassays (Lajmanovich *et al.*, 2014).

Experimental design

All the procedures were conducted following the experimentation protocols approved by the “Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República” (protocols number 474 and 684).

LC50 bioassays

The concentrations to be tested in 24-h acute toxicity tests were determined based on the concentration range obtained in preliminary tests,

using a dilution factor of 1.25. To determine the mean lethal concentration ($\text{LC50}_{24\text{h}}$), the no-observed-effect concentration (NOEC), and the lowest observed-effect concentration (LOEC), tadpoles were exposed to five nominal concentrations of SM: T1=5.0 mg/L, T2=6.2 mg/L, T3=7.8 mg/L, T4=9.8 mg/L, and T5=12.2 mg/L, and to dechlorinated filtered water as a negative control. The experiments were conducted using 1-L glass containers containing 500 mL of the test solution. Three replicates per treatment were conducted, with five tadpoles per replicate. The containers were randomly distributed. Mortality was recorded at 24 h, and determined by the absence of movement after touching the tadpoles with a plastic rod, as well as by changes in their color and appearance (Bach *et al.*, 2016). Dead individuals were immediately removed and fixed in 10% formalin.

Genotoxicity

To determine the genotoxic potential of the herbicide, 96-h acute experiments were performed. Tadpoles were exposed to three different nominal concentrations of SM ($\text{NOEC}/5=\text{Ta}$; $\text{NOEC}=\text{Tb}$ and $\text{LOEC}=\text{Tc}$), as well as to dechlorinated tap water as a negative control and 40 mg/L of CP as a positive control (Lajmanovich *et al.*, 2005; Pérez-Iglesias *et al.*, 2015). All test solutions and controls were prepared in triplicate immediately before use and replaced every 48h, in accordance with the guidelines established by USEPA (1975). The experiments were conducted using 3-L glass containers containing 2 L of the test solution. Ten tadpoles were placed in each container/replicate ($n=150$). Mortality was recorded every 24 h.

Throughout both the LC50 bioassays and genotoxicity experiments, the tadpoles were not fed, and the pH, dissolved oxygen (mg/L), conductivity, and temperature of the water were monitored in accordance with the recommendations of USEPA (1975).

Genotoxicity analysis: Micronucleus test

Blood was extracted from twelve randomly selected tadpoles per treatment (four per replicate) at 48 and 96 h of exposure and duplicate smears

were prepared on clean slides. The tadpoles were euthanized using topical lidocaine, then decapitated, and blood was extracted using heparinized capillaries, following the experimental protocols approved by the CEUA (protocols numbers 474 and 684), as stated above.

The smears were fixed with absolute alcohol and stained using the May-Grünwald Giemsa staining method (Barni et al., 2007; Lajmanovich et al., 2014). The frequencies of MN and ENA were determined in 1000 erythrocytes from each tadpole, using an optical microscope (Olympus BX41 model) under 1000x magnification (Lajmanovich et al., 2005). Coded and randomized slides were examined blind by single operator. Blood smears were photographed using an Evolution vf cooled color camera, and the images were processed using ImageJ software (National Institute of Health, USA).

To correctly identify MN, we utilized the criteria established by Fenech (2000) and Meintières et al. (2001). These criteria emphasize that MN are morphologically identical to the main cell nucleus, but smaller in size (with a diameter less than 1/3 of the main nucleus), have similar staining intensity, are not connected, or are overlapped with the main nucleus, and are located within the cytoplasm. ENA were classified as: lobed nuclei (LN), kidney-shaped nuclei (K), pyknotic nuclei (PN), notched nuclei (NN), blebbed nuclei (BbN), budded nuclei (BN), erythroplastids or anucleated erythrocytes (EP), and binucleated erythrocytes (BE) (Carrasco et al., 1990; Guilherme et al., 2008; Lajmanovich et al., 2014; 2015). The frequency of ENA was expressed as the mean value (‰) of the sum of all individual aberration types observed (Lajmanovich et al., 2014). The frequencies of MN and ENA were evaluated and compared to a positive control (40 mg/L of CP) and a negative control (filtered and dechlorinated water).

Data analyses

The lethal concentration (LC_{50}) value and its respective 95 % confidence limits were determined using the Trimmed Spearman-Kärber method (Hamilton et al., 1977). The NOEC and LOEC values were calculated using the “mixtox” pack-

age in R software (Zhu & Cheen, 2016). Linear regression analyses were performed to confirm the association between mortality and test concentrations. The frequencies of MN and ENA were determined at 48 and 96 h after initial treatment and expressed as mean $\pm$ standard error. Data of MN and other ENA were analyzed using the binomial proportion test (Margolin et al., 1983). To verify changes in genotoxic responses to the same herbicide concentrations as a function of exposure time, the frequencies of MN and ENA were compared between treatments at 48 and 96 h using the non-parametric Mann-Whitney U test. Statistical analyses were performed using PAST (Paleontological Statistics) software version 2.17c (Hammer et al., 2001); BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007); and R software version 4.2.2 (R Core Team, 2022). The Levene test was used to test for homogeneity of variances, and the Shapiro-Wilk test was used to test for normality of data. The significance level was set at $\alpha = 0.05$.

RESULTS

No mortality was observed in the negative controls in either of the two assays ($LC_{50_{24h}}$ and genotoxicity). The $LC_{50_{24h}}$ of the SM-based herbicide DG® (95 % confidence limits) was 7.0 mg/L (6.6-7.4), the NOEC was 5.0 mg/L, and the LOEC was 6.2 mg/L. A positive and significant correlation was found between mortality and the concentration of the herbicide ($R^2=0.74$; $p<0.05$). The highest concentration (12.2 mg/L of SM) resulted in the death of all tadpoles after 24 h of exposure. No mortality was recorded in the positive controls or treatments Ta (1 mg/L of SM) and Tb (5.0 mg/L of SM) in the genotoxicity assay, both at 48 and 96 h of exposure. No mortality of individuals was recorded in the Tc treatment (6.2 mg/L of SM) at 48 h. However, mortality at the highest concentration was 89 % at 96 h, and therefore the Tc treatment was not included in the genotoxicity analysis at this exposure time.

Leptodactylus luctator tadpoles presented mature oval-shaped erythrocytes, with a central nucleus and a well-defined boundary (Fig. 1A). MN were easily identified in the cellular cytoplasm as small spherical fragments, smaller than the main nucleus, and always separated from it (Fig. 1G).

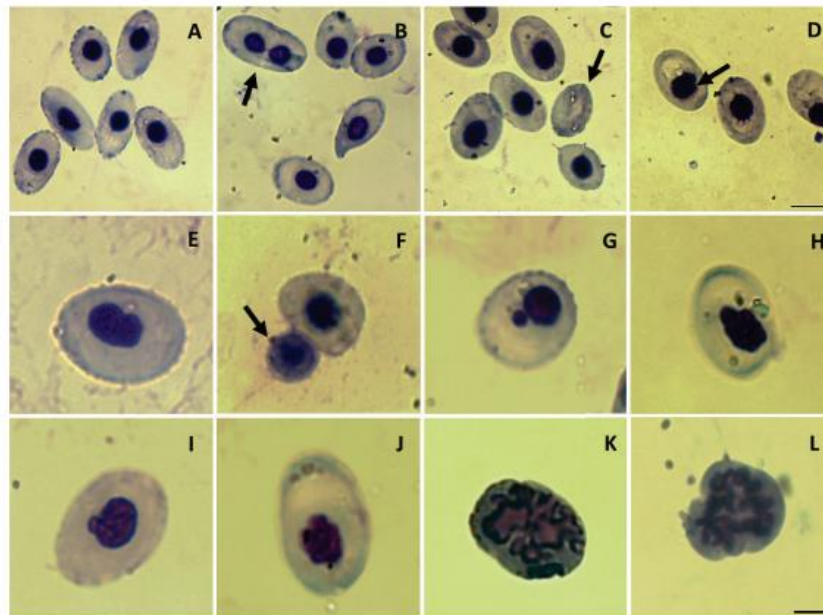


Figure 1. Details of erythrocytes observed in *Leptodactylus luctator* tadpoles exposed to the SM-based herbicide DG[®]. (A) Normal erythrocytes; (B) Binucleated erythrocyte (BE); (C) Erythroplastid or anucleated erythrocyte (EP); (D) Notched nucleus (NN); (E) Kidney-shaped nucleus (K); (F) Pyknotic nucleus (PN); (G) Micronucleus (MN); (H) Lobed nucleus (LN); (I) Budded nucleus (BN); (J) Blebbed nucleus (BbN); (K) Apoptotic cell (AP); (L) Erythrocyte in mitosis (M). May Grünwald-Giemsa staining, 100x. Black bar in image D represents a scale of 10 μ m (for images A-D). Black bar in image L represents a scale of 5 μ m (for images E-L). *Detalle de eritrocitos observados en larvas de Leptodactylus luctator expuestas al herbicida DG[®], a base de SM. (A) eritrocitos normales; (B) eritrocito binucleado (BE); (C) eritoplástido o eritrocito anucleado (EP); (D) núcleo con muesca (NN); (E) núcleo en forma de riñón (K); (F) núcleo picnótico (PN); (G) Micronúcleo (MN); (H) núcleo lobado (LN); (I) núcleo con brote (BN); (J); núcleo ampollado (BbN); (K) célula apoptótica (AP); (L) eritrocito en mitosis (M). May Grünwald-Giemsa, 100x. La barra negra en la imagen D representa una escala de 10 μ m (imágenes A-D). La barra negra en la imagen L representa una escala de 5 μ m (imágenes E-L).*

Apoptotic cells (AP) (Fig. 1K) and cells in mitosis (Fig. 1L) were also observed in tadpoles exposed to the herbicide. Figure 2 shows the frequencies of MN and responses as a function of exposure time to the different concentrations of SM evaluated. The frequency of micronucleated erythrocytes in *L. luctator* tadpoles increased with herbicide concentration at both 48 and 96 h of exposure (Fig. 2). At 48 h, the frequency of MN in treatment Ta (1 mg/L of SM) was not significantly different from that in the negative control group (Fig. 2). However, the differences between these two treatments were significant at 96 h. For the rest of the test concentrations, including the positive control (40 mg/L of CP), the frequencies of MN were significantly higher than

those in the negative control group, both at 48 and 96 h (Fig. 2).

In addition to the MN, we identified the presence of different ENA in tadpoles exposed to the herbicide (Fig. 1). We also observed an increase in the frequency of ENA at higher concentrations of SM, both at 48 and 96 h of exposure (Fig. 3). All test treatments exhibited statistically significant differences in the frequency of ENA compared to the negative control group, at both evaluation times (Fig. 3). Additionally, significant differences were observed in the frequency of ENA at 48 and 96 h between tadpoles exposed to CP and the negative control group. The frequencies of each type of ENA in each treatment at 48 and 96 h are presented in Table 1. At 48 h of ex-

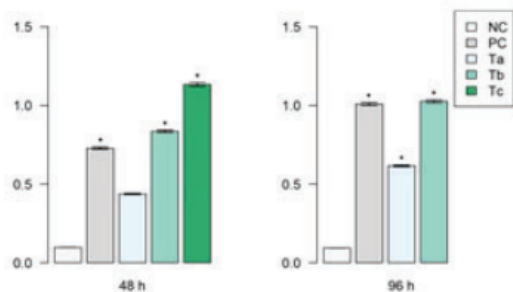


Figure 2. Frequency of micronuclei (MN) (per-1000 cells) in *Leptodactylus luctator* tadpoles exposed to different concentrations of the SM-based herbicide DG®. NC: negative control (0 mg/L of SM); PC: positive control (40 mg/L of cyclophosphamide); Ta=1 mg/L of SM; Tb=5.0 mg/L of SM; Tc=6.2 mg/L of SM. RBCs= red blood cells. * $p<0.05$: significant differences compared to the negative control (binomial proportion test). Frecuencia de micronúcleos (MN) (por 1000 células) en larvas de *Leptodactylus luctator* expuestas a diferentes concentraciones del herbicida DG®, a base de SM. NC: control negativo (0 mg/L de SM); CP: control positivo (40 mg/L de ciclofosfamida); Ta=1 mg/L de SM; Tb=5.0 mg/L de SM; Tc=6.2 mg/L de SM. * $p<0.05$: diferencias significativas con respecto al control negativo (Test de proporción binomial).

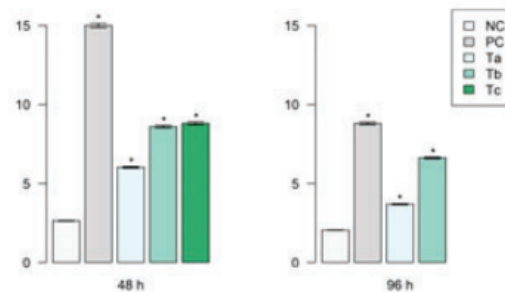


Figure 3. Frequency of erythrocytes nuclear abnormalities (ENA) (per-1000 cells) in *Leptodactylus luctator* tadpoles exposed to different concentrations of SM-based herbicide DG®. NC: negative control (0 mg/L of SM); PC: positive control (40 mg/L of cyclophosphamide); Ta=1 mg/L of SM; Tb=5.0 mg/L of SM; Tc=6.2 mg/L of SM. RBCs= red blood cells. * $p<0.05$: significant differences compared to the negative control (binomial proportion test). Frecuencia de Aberraciones nucleares en los eritrocitos (ANE) (por 1000 células) en larvas de *Leptodactylus luctator* expuestas a diferentes concentraciones del herbicida DG®, a base de SM. NC: control negativo (0 mg/L de SM); CP: control positivo (40 mg/L de ciclofosfamida); Ta=1 mg/L de SM; Tb=5.0 mg/L de SM; Tc=6.2 mg/L de SM. * $p<0.05$: diferencias significativas con respecto al control negativo (Test de proporción binomial).

posure, the frequencies of ENA were as follows: NN>EP>K>LN>AP>BbN>BE>BN>PN; whereas at 96 h, the order was as follows: EP>BE>LN>NN>BN>K>BbN>PN>AP.

No significant differences were observed in the frequencies of MN between the same test concentrations at 48 and 96 h of exposure. However, significant differences were found in the frequency of ENA at 48 and 96 h in the Ta treatment (5.0 mg/L of SM) ($U=28$; $p<0.05$), and in the positive control (40 mg/L of CP) ($U=22$; $p<0.01$).

DISCUSSION

As mentioned previously, *Leptodactylus luctator* is a common and widely distributed species in the southern cone of South America. However, still few studies have used this anuran amphibian as a test organism in ecotoxicological research (e.g., Araujo et al., 2014; Josende et al., 2015;

Lajmanovich et al., 2015; Bach et al., 2016; 2018; Samojeden et al., 2022). Although SM is one of the most commonly used herbicides in agriculture (Atwood & Paisley-Jones, 2017), with frequent use in Uruguay (Observatorio Ambiental Nacional, 2022) and the region (Andrade et al., 2021; Vera-Candioti et al., 2021; Lajmanovich et al., 2023; Van Opstal et al., 2023), its toxicity and genotoxic effects on *L. luctator* tadpoles have not yet been studied.

The $LC50_{24h}$ value for the herbicide DG®, determined in this study for *L. luctator* tadpoles, was 7.0 mg/L. Studies on the acute toxicity of SM and SM-based commercial formulations on amphibian tadpoles are scarce. A $LC50_{24h}$ value of 56 mg/L has been reported for the commercial formulation Primextra® II (35.8 % SM, 28.7% of atrazine) on *Lithobates catesbeianus* tadpoles (Wan et al., 2006), and a $LC50_{192h}$ value of 37.5

Table 1. Frequency (%) of different types of erythrocytes nuclear abnormalities (ENA) in *L. luctator* tadpoles exposed to different concentrations of SM (mean $\pm$ SE). NC: negative control (0 mg/L of SM); PC: positive control (40 mg/L of cyclophosphamide); Ta=1 mg/L of SM; Tb=5.0 mg/L of SM; Tc=6.2 mg/L of SM; BE: binucleated erythrocytes; K: kidney-shaped nuclei; EP: erythroplasts or anucleated erythrocytes; BN: budded nuclei; LN: lobed nuclei; BbN: blebbed nuclei; NN: notched nuclei; PN: pyknotic nuclei; AP: apoptotic cells. * $p < 0.05$: significant differences compared to the negative control (binomial proportion test). *Frecuencia (%) de distintos tipos de aberraciones nucleares en eritrocitos (ANE) de larvas de L. luctator expuestas a diferentes concentraciones de SM (media $\pm$ SE). NC: control negativo (0 mg/L de SM); CP: control positivo (40 mg/L de ciclofosfamida); Ta=1 mg/L de SM; Tb=5.0 mg/L de SM; Tc=6.2 mg/L de SM; BE: eritrocitos binucleados; K: núcleos en forma de riñón; EP: eritoplástidos o eritrocitos anucleados; BN: núcleos con brotes; LN: núcleos lobados; BbN: núcleos ampollados; NN: núcleos con muescas; PN: núcleos picnóticos; AP: célula apoptótica. * $p < 0.05$: diferencias significativas con respecto al control negativo (Test de proporción binomial).*

ENA	h	Treatments				
		NC	PC	Ta	Tb	Tc
BE	48	0.78 $\pm$ 0.01	2.72 $\pm$ 0.02*	1.05 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.01	0.38 $\pm$ 0.004
K		0.58 $\pm$ 0.01	2.18 $\pm$ 0.02*	1.14 $\pm$ 0.01	1.67 $\pm$ 0.02*	0.50 $\pm$ 0.01
EP		0.39 $\pm$ 0.004	2.72 $\pm$ 0.02*	0.61 $\pm$ 0.01	1.42 $\pm$ 0.01*	1.89 $\pm$ 0.02*
BN		0	0.54 $\pm$ 0.005	0.44 $\pm$ 0.004	0.33 $\pm$ 0.003	0.25 $\pm$ 0.003
LN		0.39 $\pm$ 0.004	1.64 $\pm$ 0.02*	0.96 $\pm$ 0.01	0.92 $\pm$ 0.01	1.26 $\pm$ 0.01*
BbN		0.19 $\pm$ 0.002	1.09 $\pm$ 0.01*	0.09 $\pm$ 0.001	0.50 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.01
NN		0.29 $\pm$ 0.003	3.27 $\pm$ 0.03*	1.14 $\pm$ 0.01*	1.92 $\pm$ 0.02*	1.76 $\pm$ 0.02*
PN		0	0.45 $\pm$ 0.004	0.09 $\pm$ 0.001	0.33 $\pm$ 0.003	0.38 $\pm$ 0.004
AP		0	1.27 $\pm$ 0.01	0.52 $\pm$ 0.01	0.67 $\pm$ 0.01	1.89 $\pm$ 0.02
BE	96	0.37 $\pm$ 0.004	1.93 $\pm$ 0.02*	0.97 $\pm$ 0.01*	1.03 $\pm$ 0.01*	-
K		0.28 $\pm$ 0.003	1.10 $\pm$ 0.01*	0.09 $\pm$ 0.001	0.47 $\pm$ 0.004	-
EP		0.93 $\pm$ 0.01	1.65 $\pm$ 0.02	1.49 $\pm$ 0.01	2.24 $\pm$ 0.02*	-
BN		0.19 $\pm$ 0.002	0.73 $\pm$ 0.01*	0.35 $\pm$ 0.003	0.47 $\pm$ 0.004	-
LN		0	0.92 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.005	0.84 $\pm$ 0.01	-
BbN		0	0.55 $\pm$ 0.01	0	0.47 $\pm$ 0.004	-
NN		0.19 $\pm$ 0.002	1.65 $\pm$ 0.02*	0.26 $\pm$ 0.002	0.75 $\pm$ 0.01*	-
PN		0	0.18 $\pm$ 0.002	0	0.28 $\pm$ 0.003	-
AP		0.09 $\pm$ 0.001	0.09 $\pm$ 0.001	0	0.09 $\pm$ 0.001	-

mg/L has been reported for SM on embryos of the common frog *Pelophylax perezi* (Quintaneiro *et al.*, 2018). Our results suggest that *L. luctator* tadpoles are less tolerant to SM than *P. perezi* embryos. Differences in sensitivity could be attributed to intrinsic differences between species, as well as to the different developmental stages evaluated, and to the commercial formulation used in this study, which, in addition to the active ingredient contains

excipients such as surfactants and solvents, which may influence its toxicity. Previous studies have shown that a commercial formulation of various agrochemicals may be more toxic than the active ingredient itself (Könen & Çava, 2008; Nikoloff *et al.*, 2013; Lajmanovich *et al.*, 2014; Bach *et al.*, 2016). While DG[®] contains more than twice the amount of SM in its formulation than Primextra[®] II, it is not possible to directly compare the sensi-

tivity of *L. luctator* tadpoles with that of *L. catesbeianus*. This is because Primextra® II, in addition to SM, contains another active ingredient, atrazine, which can also influence the toxicity level of the formulation. Our results demonstrate the acute toxicity of the herbicide DG® on exposed *L. luctator* tadpoles. Given that, in the field, pesticides are applied in commercial formulations, it is recommended to use these compounds to assess the real risk of agrochemical products.

Previous studies have reported a LC50_{24h} value of 7.13 (6.80-7.55) mg/L for Roundup ULTRA MAX® (RU®), an herbicide based on Glyphosate, and a LC50_{48h} value of 22.45 (19.59-25.73) mg/L for the biopesticide *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Introbans), on tadpoles of *L. luctator* (Bach et al., 2016; Lajmanovich et al., 2015). The LC50_{24h} value obtained for DG® in this study is similar to that reported for RU®, which would allow us to affirm that *L. luctator* tadpoles at GS25 stage (the stage evaluated in both studies) present a similar sensitivity range to the commercial formulations of both herbicides. Mean lethal concentration values obtained in laboratory bioassays are useful for comparing the effects of agrochemicals on non-target aquatic organisms (Lajmanovich et al., 2015). Considering this aspect, and that SM is one of the most widely used herbicides, further studies are necessary to evaluate the acute toxicity of different commercial formulations of SM, in order to compare the sensitivity ranges among amphibian species.

Our results demonstrate that the SM-based herbicide DG® induces the formation of MN and other ENA in the peripheral blood of *L. luctator* tadpoles. The frequencies of MN and ENA in tadpoles exposed to different test concentrations and CP were significantly higher than those in the negative control group, both at 48 and 96 h of exposure, except for the lowest concentration of SM tested, for which significant differences were observed only at 96 h. Therefore, we suggest that the genotoxic effects of this herbicide manifest within the first 48 h of larval exposure. Similar results have been previously observed for *Rhinella arenarum* tadpoles (GS 29-31), where genetic alterations caused by sublethal concentrations of the herbicide Liberty® (which contains ammonium glufosinate) were observed within the first

48 h of exposure (Lajmanovich et al., 2015). In contrast, in *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (GS 36), Pérez-Iglesias et al. (2015) found that the herbicide Pivot Hs (which contains imazethapyr) increased the frequency of MN only at the highest sublethal concentration tested at 48 h, while, at 96 h, the herbicide was able to induce other ENA and a higher frequency of MN at all the concentrations tested. In the present study, the lack of significant differences in the frequency of MN between the same treatments at 48 and 96 h would indicate that, at the test concentrations, the maximum genotoxic potential is reached within the first 48 h of exposure to the herbicide. However, we found significant differences in the frequency of ENA between the lowest test concentration (1 mg/L of SM) at 48 and 96 h of exposure, which would indicate that the time of exposure increases the cyto-genotoxicity at these sublethal concentration levels. This result is significant because we consider the concentration of 1 mg/L of SM to be the most relevant among the concentrations tested, as it closely approximates the concentrations of SM reported in agricultural environments (15 µg/L of SM) (Van Opstal et al., 2023).

We identified nine different types of ENA in tadpoles exposed to the different test concentrations, with a predominance of the following abnormalities: notched nuclei (NN), erythroplastids (EP), kidney-shaped nuclei (K), binucleated erythrocytes (BE), and lobed nuclei (LN). The mechanism responsible for generating all known types of ENA has not yet been fully explained; however, several studies have indicated that these aberrations are induced in response to the exposure to genotoxic agents (Tolbert et al., 1992; Serrano-García & Montero-Montoya, 2001; Cavas & Ergene-Gözükar, 2005; Bolognesi et al., 2006; Pérez-Iglesias et al., 2015). The lack of uniform criteria in the literature score ENA makes comparison between results difficult (Bolognesi et al., 2006; Guilherme et al., 2008). Serrano-García & Montero-Montoya (2001), for example, suggested that the origin of budding or nuclear cell sprouts and BE is similar to that of MN and that both are genotoxic events. Bolognesi et al. (2006), on the other hand, found a positive association between the frequency of nuclear buds

and MN and suggested that nuclear invaginations (e.g., kidney-shaped nuclei, notched nuclei) are abnormalities primarily associated with cytotoxicity, whereas Cavas & Ergene-Gözükara (2005) suggested that blebbed and lobulated nuclei are also indicators of genotoxic damage. Pyknotic nuclei are associated with apoptosis, and their prevalence allows inferring the occurrence of cell death (Tolbert *et al.*, 1992), since their frequency increases in the presence of cell damage (Ray *et al.*, 2005). Tolbert *et al.* (1992) mentioned that a level of apoptosis above normal would indicate genotoxic aggression. In the present study, the high frequency of apoptotic cells observed in tadpoles exposed to the concentration of 6.2 mg/L of SM at 48 h would be related to the high larval mortality recorded for this treatment at 96 h of exposure. Finally, anucleated red blood cells or erythroplastids have been proposed to be more frequent in the blood of larvae exposed to contaminated water and to arise to make oxygen transport more efficient by improving the cell surface-to-volume ratio (Barni *et al.*, 2007).

Nikoloff *et al.* (2013) also showed the genotoxic and cytotoxic effects of SM-based herbicides, such as Twin Pack Gold® (96 % active ingredient), in human hepatoma cells (HepG2). These authors showed that the commercial formulation was capable of inducing the formation of MN, as well as a significant reduction in mitochondrial activity, while pure SM did not have these effects. Similar results have been reported for amphibians by Lajmanovich *et al.* (2014) for the herbicide ammonium glufosinate and its commercial formulation Liberty®, in *Rhinella arenarum* larvae. The differences found would indicate that the inert ingredients of the commercial formulation play a key role in the induction of genotoxicity. Therefore, we emphasize the importance of evaluating commercial formulations, as has been done in the present study, in order not to underestimate effects. On the other hand, Paunescu *et al.* (2018) demonstrated the toxic effects of sublethal doses of DG® (the same commercial formulation used in the present study) on adult individuals of *Pelophylax ridibundus*, highlighting physiological, biochemical, and histological alterations in exposed frogs. Our results complement those obtained by these authors and allow us to infer that

the SM-based herbicide DG® has potential cytotoxic and genotoxic effects on *L. luctator* tadpoles and that it thus poses a risk to the amphibians that inhabit agroecosystems.

In conclusion, *Leptodactylus luctator* tadpoles have demonstrated sensitivity to the SM-based herbicide DG®, as well as to other herbicides (e.g., Lajmanovich *et al.*, 2015; Bach *et al.*, 2016) and insecticides (Samojeden *et al.*, 2022). Therefore, this species could be considered a good biological model to assess the potential risk of pesticides. Additionally, we highlight the importance of blood biomarkers as early warning signals to detect adverse effects caused by agrochemicals (Ossana *et al.*, 2013; Attademo *et al.*, 2014; Lajmanovich *et al.*, 2021). In the Pampa Biome, agricultural activity plays a central role, and this study would be the first to evaluate the effects of acute toxicity (LC50) and cytogenotoxicity of an SM-based herbicide on amphibians in the region.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support received from the Comisión Sectorial de Investigación Científica [Project 28, CSIC I+D 2018] and the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay. GP acknowledges the Comisión Académica de Posgrado (CAP) of the Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, for the postgraduate scholarship. GP and RM acknowledges the financial support provided by the Sistema Nacional de Investigadores of the Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay.

REFERENCES

- Andrade, V. S., Gutierrez, M. F., Regaldo, L., Paira, A. R., Repetti, M. R., & Gagneten, A. M. (2021). Influence of rainfall and seasonal crop practices on nutrient and pesticide runoff from soybean dominated agricultural areas in Pampean streams, Argentina. *Science of the Total Environment*, 788, 147676. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.147676.
- Araújo, C. V., Shinn, C., Moreira-Santos, M., Lopes, I., Espíndola, E. L., & Ribeiro, R. (2014). Copper-driven avoidance and mortal-

- ity in temperate and tropical tadpoles. *Aquatic toxicology*, 146, 70-75. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.10.030.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., & Lajmanovich, R. C. (2005). Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, ecosystems & environment*, 106(4), 389-394. DOI: 10.1016/j.agee.2004.08.012.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenkhusen, M. C., Junges, C. M., & Basso, A. (2014). Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 186, 635-649. DOI: 10.1007/s10661-013-3404-z.
- Atwood, D., & Paisley-Jones, C. (2017). Pesticides industry sales and usage: 2008–2012 market estimates. *US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 20460*, 2017-01.
- Ayres, M., Ayres, J. R. M., Ayres, D. L., & Santos, A. S. (2007). BioEstat 5.0-aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. Brasília: CNPq.
- Bach, N. C., Natale, G. S., Somoza, G. M., & Ronco, A. E. (2016). Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 23959-23971. DOI: 10.1007/s11356-016-7631-z.
- Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultra-max, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.110.
- Baeza, S., Vélez-Martin, E., De Abelleira, D., Bancharo, S., Gallego, F., Schirmbeck, J., ... & Hasenack, H. (2022). Two decades of land cover mapping in the Río de la Plata grassland region: The MapBiomass Pampa initiative. *Remote Sensing Applications: Society and Environment*, 28, 100834. DOI: 10.1016/j.rsase.2022.100834.
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., & Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 45-54. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.10.012.
- Benvindo-Souza, M., Oliveira, E. A. S., Assis, R. A., Santos, C. G. A., Borges, R. E., e Silva, D. D. M., & de Souza Santos, L. R. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240, 124910. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124910.
- Bionda, C. D. L., Babini, S., Martino, A. L., Salas, N. E., & Lajmanovich, R. C. (2018). Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad *Rhinella arenarum* (anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation*, 14, e00398. DOI: 10.1016/j.gecco.2018.e00398.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., & Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic toxicology*, 78, S93-S98. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.02.015.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123-2136. DOI: 10.1139/f90-237.
- Carreira, S. & Maneyro, R. (2015). *Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay*. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo, Uruguay.
- Çavaş, T., & Ergene-Gözükara, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology*, 74(3), 264-271. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.06.001.
- de Arcaute, C. R., Brodeur, J. C., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2020). Toxicity to *Rhi-*

- nella arenarum* tadpoles (Anura, Bufonidae) of herbicide mixtures commonly used to treat fallow containing resistant weeds: glyphosate–dicamba and glyphosate–flurochloridone. *Chemosphere*, 245, 125623. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125623.
- De Liguoro, M., Bona, M. D., Gallina, G., Capolongo, F., Gallochio, F., Binato, G., & Di Leva, V. (2014). A monitoring of chemical contaminants in waters used for field irrigation and livestock watering in the Veneto region (Italy), using bioassays as a screening tool. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 3546–3557. DOI: 10.1007/s11356-013-2357-7.
- Eterovick, P. C., Sloss, B. L., Scalzo, J. A., & Alford, R. A. (2016). Isolated frogs in a crowded world: Effects of human-caused habitat loss on frog heterozygosity and fluctuating asymmetry. *Biological Conservation*, 195, 52–59. DOI: 10.1016/j.biocon.2015.12.036.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 81–95. DOI: 10.1016/S0027-5107(00)00065-8.
- Freitas, J. S., Girotto, L., Goulart, B. V., Alho, L. D. O. G., Gebara, R. C., Montagner, C. C., ... & Espíndola, E. L. G. (2019). Effects of 2, 4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotoxicology and environmental safety*, 182, 109446. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109446.
- Gilliom, R. J., Barbash, J. E., Crawford, C. G., Hamilton, P. A., Martin, J. D., Nakagaki, N., ... Wolock, D. M. (2006). Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992–2001: U.S. Geological Survey Circular 1291, The Quality of Our Nation's Waters. DOI:10.3133/cir1291.
- 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. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.08.016.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190.
- Gripp, H. S., Freitas, J. S., Almeida, E. A., Bisinoti, M. C., & Moreira, A. B. (2017). Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 173–179. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.10.027.
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., & Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental science & technology*, 11(7), 714–719. DOI: 10.1021/es60130a004.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia electronica*, 4(1), 9.
- Heyer, R., Langone, J., La Marca, E., Azevedo-Ramos, C., di Tada, I., Baldo, D., ... & Hardy, J. (2010). *Leptodactylus latrans*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e. T57151A11592655. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed on 23 February 2023.
- IUCN 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed on 23 February 2023.
- Josende, M. E., Tozetti, A. M., Alalan, M. T., Mathies Filho, V., da Silva Ximenez, S., da Silva Júnior, F. M. R., & Martins, S. E. (2015). Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators*, 49, 83–87. DOI: 10.1016/j.ecolind.2014.10.007.
- Könen S., & Çavaş T. (2008). Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49, 434–438. DOI: 10.1002/em.20401.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna, M., Peltzer, P. M., Stringhini, G. A., & Attademo, A. M. (2005). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1–2), 67–72. DOI:

- 10.1016/j.mrgentox.2005.08.001.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Bassó, A., & Lorenzatti, E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 7-12. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2014.04.009.
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Maglianesi, M., ... & Beccaria, A. J. (2015). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. *Environmental Research*, 136, 205-212. DOI: 10.1016/j.envres.2014.10.022.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., Attademo, A. M., Colussi, C. L., & Basso, A. (2018). Acute toxicity of colloidal silicon dioxide nanoparticles on amphibian larvae: emerging environmental concern. *International Journal of Environmental Research*, 12, 269-278. DOI: 10.1007/s41742-018-0089-8.
- Lajmanovich, R. C., Cuzziol Boccioni, A. P., Curi, L. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C., Bassó, A., Colussi, C., & Peltzer, P. M. (2021). Técnicas para el relevamiento de anfibios en ambientes contaminados. Pereyra, L., Etchepare, E., & Vaira, M (eds.): In: *Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina*. (pp. 326-347). Universidad Nacional de Jujuy, Argentina.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Lener, G., Boccioni, A. P. C., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., ... & Repetti, M. R. (2022). Glyphosate and glufosinate ammonium, herbicides commonly used on genetically modified crops, and their interaction with microplastics: Ecotoxicity in anuran tadpoles. *Science of The Total Environment*, 804, 150177. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150177.
- Lajmanovich, R. C., Repetti, M. R., Boccioni, A. P. C., Michlig, M. P., Demonte, L., Attademo, A. M., & Peltzer, P. M. (2023). Cocktails of pesticide residues in *Prochilodus lineatus* fish of the Salado River (South America): First record of high concentrations of polar herbicides. *Science of The Total Environment*, 870, 162019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.162019.
- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., & Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. DOI: 10.1080/10807039.2015.1133242.
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., & Liu, W. (2006). A comparative study of rac-and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), 451-455. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.02.002.
- Liu, S., Wang, L., Chen, K., Yang, H., Ling, M., Wu, L., ... & Bai, L. (2022). Combined effects of S-metolachlor and benoxacor on embryo development in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 238, 113565. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.113565.
- Magalhães, F. D. M., Lyra, M. L., De Carvalho, T. R., Baldo, D., Brusquetti, F., Burella, P., ... & Garda, A. A. (2020). Taxonomic review of South American Butter Frogs: Phylogeny, geographic patterns, and species delimitation in the *Leptodactylus latrans* species group (Anura: Leptodactylidae). *Herpetological Monographs*, 34(1), 131-177. DOI: 10.1655/HERPMONOGRAPHS-D-19-00012
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., & Cachot, J. (2013). Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 89, 1-8. DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.04.003.
- Maneyro R. & Carreira S. (2012). *Guía de anfibios del Uruguay*. 2da ed, Colección Ciencia amiga-Ediciones de la Fuga. Montevideo, Uruguay.
- Margolin, B. H., Collings, B. J., & Mason, J. M. (1983). Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments

- with binomial responses. *Environmental mutagenesis*, 5(5), 705-716. DOI: 10.1002/em.2860050509.
- McDaniel, T. V., Martin, P. A., Struger, J., Sherry, J., Marvin, C. H., McMaster, M. E., ... & Tetreault, G. (2008). Potential endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) from areas of intensive row crop agriculture. *Aquatic Toxicology*, 88(4), 230-242. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.05.002.
- Meintières, S., Biola, A., Pallardy, M., & Marzin, D. (2001). Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. *Mutagenesis*, 16(3), 243-250. DOI: 10.1093/mutage/16.3.243.
- Nardo, D., Evia, G., Castiglioni, E., Egaña, E., Galletta, G., Laporta, M., & Chichet, M. E. N. (2015). Determinación de glifosato mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) en el paisaje protegido Laguna de Rocha y su entorno, Uruguay. *Innotec*, (10), 64-70.
- Nikoloff, N., Escobar, L., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2013). Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and chemical toxicology*, 62, 777-781. DOI: 10.1016/j.fct.2013.10.015.
- Observatorio Ambiental Nacional. 2022. Datos abiertos. Datos propios y de otras instituciones vinculadas a la gestión ambiental. Ministerio de Ambiente. Montevideo, Uruguay. <https://www.ambiente.gub.uy/oan/datos-abiertos/>. Accessed on 24 November 2022.
- Osano, O., Admiraal, W., & Otieno, D. (2002). Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(2), 375-379. DOI: 10.1002/etc.5620210221.
- Ossana, N. A., Castañé, P. M., & 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, 486-497. DOI: 10.1007/s00244-013-9920-6.
- PAN Pesticide Database. (2022). Metolachlor, (S). Pesticide Action Network, North America. Accessed on 24 January 2023.
- Paunescu, A., Soare, L. C., Fierascu, R. C., Fierascu, I., & Ponopal, M. C. (2018). The influence of six pesticides on physiological indices of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 100, 376-383. DOI: 10.1007/s00128-018-2277-9.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Cabagna-Zenkhusen, M. C., Repetti, M. R., ... & Beldoménico, H. (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. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.010.
- Pérez-Iglesias, J. M., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G. S., & Larramendy, M. L. (2015). Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on montevidео tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 15-24. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.04.045.
- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Natale, G. S., & de Oliveira, C. (2019). Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental pollution*, 244, 733-746. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.10.073.
- Pollo, F. E., Bionda, C. L., Salinas, Z. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2015). Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental monitoring and assessment*, 187, 1-9. DOI:10.1007/s10661-015-4802-1.
- Quintaneiro, C., Patrício, D., Novais, S. C., Soares, A. M. V. M., & Monteiro, M. S. (2017). Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish devel-

- oping embryos. *Science of the Total Environment*, 586, 390-400. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.153.
- Quintaneiro, C., Soares, A. M., & Monteiro, M. S. (2018). Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. *Chemosphere*, 194, 595-601. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.171.
- R Core Team. (2022). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Accessed on 23 March 2022.
- Ray, M. R., Basu, C., Mukherjee, S., Roychowdhury, S., & Lahiri, T. (2005). Micronucleus frequencies and nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of firefighters. *International Journal of Human Genetics*, 5(1), 45-48. DOI: 10.1080/09723757.2005.11885915.
- Saccol, S. D. S. A., Bolzan, A. M. R., & dos Santos, T. G. (2017). In the shadow of trees: does eucalyptus afforestation reduce herpetofaunal diversity in Southern Brazil?. *South American Journal of Herpetology*, 12(1), 42-56. DOI: 10.2994/SAJH-D-16-00028.1.
- Samojeden, C. G., Pavan, F. A., Rutkoski, C. F., Folador, A., da Fré, S. P., Müller, C., ... & Hartmann, M. (2022). Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). *Scientific Reports*, 12(1), 11926. DOI: 10.1038/s41598-022-16039-z.
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31,9-15. DOI: 10.1016/0165-1161(75)90058-8.
- Serrano-García, L., & Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and molecular mutagenesis*, 38(1), 38-45. DOI: 10.1002/em.1048.
- Shaner, D. L., Brunk, G., Belles, D., Westra, P., & Nissen, S. (2006). Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(7), 617-623. DOI: 10.1002/ps.1215.
- Stara, A., Kubec, J., Zuskova, E., Buric, M., Faggio, C., Kouba, A., & Velisek, J. (2019). Effects of S-metolachlor and its degradation product metolachlor OA on marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). *Chemosphere*, 224, 616-625. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.02.187.
- Tolbert, P. E., Shy, C. M., & Allen, J. W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271(1), 69-77. DOI: 10.1016/0165-1161(92)90033-I.
- Unrine, J. M., Hopkins, W. A., Romanek, C. S., & Jackson, B. P. (2007). Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: implications for amphibian health and contaminant transport. *Environmental Pollution*, 149(2), 182-192. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.01.039.
- USEPA. 1975. USEPA 660/375-009. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians. United States Environmental Protection Agency. Manual. Washington, D.C., EUA.
- Vallotton, N., Moser, D., Eggen, R. I., Junghans, M., & Chèvre, N. (2008). S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere*, 73(3), 395-400. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.05.039.
- Van Opstal, N. V., Gabioud, E. A., Seehaus, M. S., Pighini, R. J., Repetti, M. R., Wilson, M. G., ... & Sasal, M. C. (2023). Spatial distribution of pesticides in surface water of the Estacas stream (Argentine Espinal region) associated with crop production. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(15), 43573-43585. DOI: 10.1007/s11356-023-25373-2.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Kubec, J., Buric, M., & Kouba, A. (2019). Effects of s-metolachlor on early life stages of marbled crayfish. *Pesticide biochemistry and physiology*, 153, 87-94. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.11.007.
- Vera-Candioti, J., Araujo, P. I., Huerga, I. R., Rojas, D. E., Cristos, D. S., & Malmantile, A. D. (2021). Pesticides detected in surface and groundwater from agroecosystems in the Pampas region of Argentina: occurrence and ecological risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193, 1-20. DOI:

- 10.1007/s10661-021-09462-8.
- Wan, M. T., Buday, C., Schroeder, G., Kuo, J., & Pasternak, J. (2006). Toxicity to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus tshawytscha*, and *Rana catesbeiana* of atrazine, metolachlor, simazine, and their formulated products. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 76(1), 52-58. DOI: 10.1007/s00128-005-0888-4.
- Wells, K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press.
- Williams, B. K., & Semlitsch, R. D. (2010). Larval responses of three Midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 819-827. DOI: 10.1007/s00244-009-9390-z.
- Zhelev, Z., Tsonev, S., Georgieva, K., & Arnautova, D. (2018). Health status of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in Southern Bulgaria and its importance in assessing environmental state: haematological parameters. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 7884-7895. DOI: 10.1007/s11356-017-1109-5
- Zhu, X. W., & Chen, J. Y. (2016). mixtox: An R Package for Mixture Toxicity Assessment. *R J.*, 8(2), 421.

ANEXO II.

Sitios de estudio

Capítulo1. Efectos de la actividad forestal sobre los ensambles de anfibios anuros en el departamento de Treinta y Tres, Uruguay.

El estudio se llevó a cabo en el Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos y Sierras del Yermal (PPQC y SY) ($32^{\circ}55'39''\text{S}$; $54^{\circ}27'25''\text{O}$) (Figura 1), y su área adyacente (Figura 2), ubicado en el departamento de Treinta y Tres, región centro-este de Uruguay. La Quebrada de los Cuervos compone un sistema de sierras, que cumple una función importante como conector de los distintos ambientes serranos del sur del país y los bosques subtropicales de Río Grande do Sul (Brasil) (Rodríguez-Gallego, 2008). Integra el grupo de quebradas del noreste uruguayo con relictos de selva subtropical y forma parte del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) del Uruguay, desde el año 2008 (Decreto n°462/008). Entre los diferentes ambientes presentes en el área protegida se destacan el bosque de quebrada y galería junto al sistema fluvial, y las praderas naturales (cubren el 50 % del área), que contienen especies de flora y fauna prioritarias para el SNAP (SNAP, 2010). En esta zona, las precipitaciones ocurren durante todo el año, pero son mayores durante el verano y el otoño. Para los últimos 50 años, la precipitación acumulada anual fue de 1600 mm; mientras que la temperatura media anual fue de 17°C (INIA, 2022).



Figura 1. Quebrada de los Cuervos y Sierras del Yermal. Fotografía: Ernesto Elgue.

El PPQC y SY cubre una superficie de aproximadamente 4413 hectáreas, y se encuentra comprendido dentro de la cuenca del Arroyo Yermal Grande (SNAP, 2010). Estas tierras son de carácter público-privado, distinguiéndose cuatro propietarios: 1) Intendencia de Treinta y Tres (365 has excluidas del ganado doméstico desde 1996); 2)

Familia Demicheli (1.247 has); 3) Empresa maderera Weyerhaeuser Uruguay S.A. (479 has); y 4) Ministerio de Defensa (2321has). Según el decreto 462/08 del 29 de setiembre de 2008, el área adyacente oficial abarca las partes restantes de la microcuenca del Arroyo Yermal Chico. Una de las principales presiones que ocurren actualmente en el área adyacente al PPQC y SY es el avance de la forestación con monocultivos de pinos y eucaliptus (se estima en no menos de 6000 has). Todos los suelos del área protegida y el 90% de los suelos de la zona adyacente son de prioridad forestal (SNAP, 2010). Por lo tanto, el fenómeno de intensificación y expansión de la forestación que ocurrió en la zona se debió a las políticas de estado que beneficiaron a los emprendimientos que se desarrollaron en estos suelos (Panario & Gutiérrez, 2007).

Cabe destacar que, dentro de los límites del área protegida, existe una zona de pastizal natural, que se ha excluido de toda actividad ganadera y de cualquier otro tipo de actividad antrópica durante los últimos 20 años. Esto le confiere un importante grado de naturalidad a este ecosistema que ha sido significativamente modificado en todo el Uruguay y también en la región. Esta zona de exclusión ($32^{\circ}54'27.00''S$ $54^{\circ}26'56.03''O$) está comprendida dentro de las 365 hectáreas que pertenecen a la Intendencia de Treinta y Tres. El hecho de contar con un área “control” con estas características dentro del PPQC, ha despertado el interés de la comunidad científica. En esta zona de exclusión seleccionamos tres cuerpos de agua de referencia o control (Figura 2). Además, seleccionamos dos cuerpos de agua en una forestación de pinos activa dentro del área adyacente al PPQC y SY (FB) (Figura 2 y 3); y otros dos charcos en un sitio forestal recientemente cosechado (FA) (Figura 2 y 3). En este último sitio existió una forestación de Pinos con fines comerciales, pero debido a su proximidad al área protegida, las autoridades ambientales de Uruguay decidieron que el rodal debía ser talado.

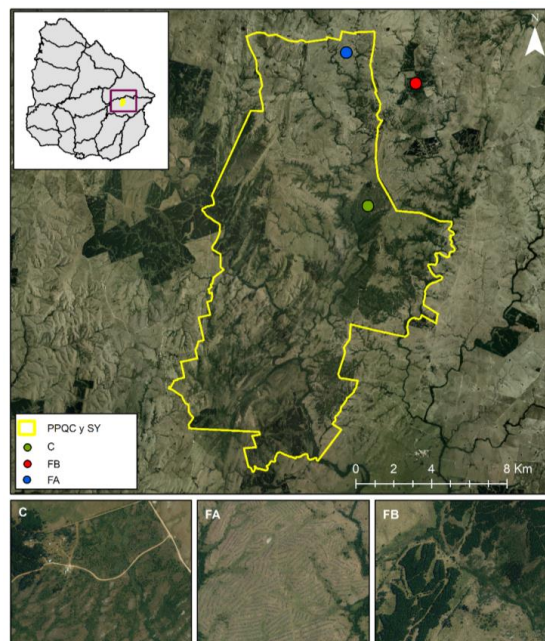


Figura 2. Área de estudio. La línea amarilla delimita la zona del Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos y Sierras del Yermal. La marca verde representa el sitio Control (C); la marca roja representa el sitio donde se ubica la plantación activa de pinos (FB); y la marca azul representa a la zona cosechada (FA).



Figura 3. Sitios de muestreo dentro del área de estudio. A. Charco Ch1NF dentro del sitio control (C); B. Charco Ch1FA dentro de la zona cosechada (FA); C. Charco Ch2FB dentro de la plantación activa de pinos (FB).

Capítulo 2. Toxicidad de sedimentos en charcos asociada a la aplicación de agroquímicos en un sitio forestal: su efecto sobre larvas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae).

El estudio se llevó a cabo en un predio forestal (F) de 1500 ha, ubicado sobre la ruta 8 en el Departamento de Treinta y Tres, Uruguay, a 35 km de la entrada al PPQC y SY (Figura 4). Allí se plantó en el año 2020 *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus dunnii*. El establecimiento se ubica en la zona 2 de la CIDE, con suelos de prioridad forestal (90% aprox.). Previo a la plantación el uso del establecimiento fue pastoril, con una importante área de campo natural con historia agrícola y ganadera (Informe ambiental proyecto Forestal 9 de julio, 2019). Alrededor de esta plantación se observan otros cultivos, forestación y zonas de pastizal natural. En esta forestación fueron seleccionados dos cuerpos de agua para monitoreo, uno permanente (Ch2F, área 835 m²); y otro temporal (Ch6F, área 569 m²) (Figura 5 A y B).



Figura 4. Sitio de estudio. Fotografía: Raúl Maneyro.

Según datos proporcionados por el Ingeniero Agrónomo responsable del manejo de la forestación, 5 días previos al inicio de plantación se comenzó con un control de malezas mecanizado en el área total, donde se aplicó glifosato (3lt-3,5lt/ha) (Formulado Comercial (FC) Pampa Gold y Pampa Premium), S-metolacoloro (1lt/ha) (FC Dual Gold[®], sulfentrazone (0,5lt/ha) (FC Coral y Golpe). Aparte de esto un coadyuvante y corrector de pH, nombre comercial Hammer (dosis: dos cajas/3000lts de agua). Para el control de hormigas se utilizó el insecticida Lampo cuyo i.a es el fipronil (dosis: 3 kg por ha); previo a la plantación, durante e inmediatamente después de terminada la misma. La fertilización se realizó al momento de la plantación con el fertilizante Multicote (10 g por planta). A los 30-45 días posteriores a la primera aplicación, se realizó otro control de malezas en el área total mecanizado, utilizando el producto pre-emergente Isoxaflutole (0,3kg/ha) (FC Zethin y Condor), también se volvió a aplicar S-metolacoloro (1lt/ha) y Hammer a la misma dosis que en pre-plantación. A los 45-60 días posteriores a la primera aplicación se aplicó post-plantación de forma manual en filas glifosato (dosis: 3-3,5 lt/ha). Luego se aplicó la misma dosis en entrefilas de forma mecanizada. También se aplicó de forma combinada y mecanizada en fila-entrefila Isoxaflutole (dosis: 0,3kg/ha), y haloxyfop R-metil (dosis: 200-,250 lt/ha) (FC Verdict HL). Los herbicidas se aplicaron utilizando maquinas pulverizadoras acopladas a la toma de fuerza del tractor y también se realizaron aplicaciones manuales con mochilas. El hormiguicida se aplicó de manera mecanizada, con un equipo hartwich acoplado a tractor.

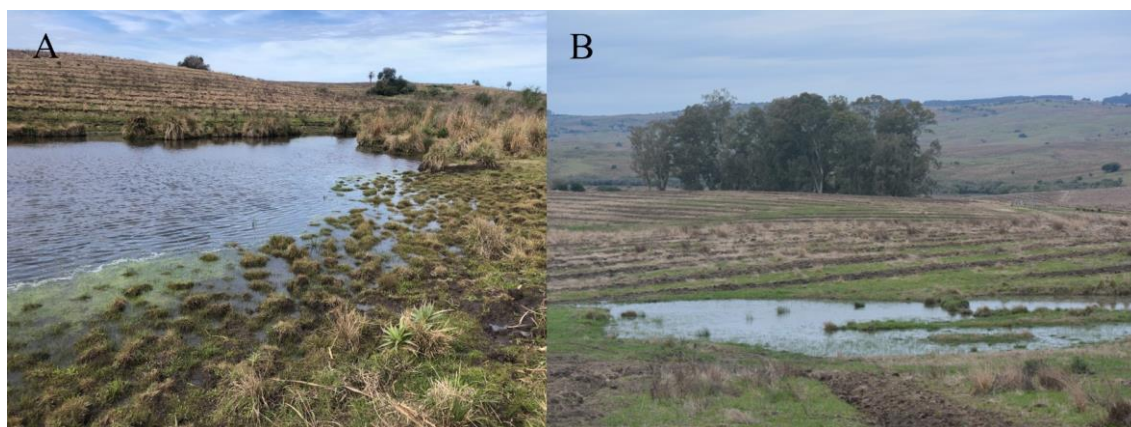


Figura 5. Sitios de muestreo dentro del área de estudio. A. Charco Ch2F; B. Charco Ch6F.

BIBLIOGRAFÍA

Informe ambiental del Proyecto Forestal 9 de Julio (número de expediente: 2019/14000/13407).
Noviembre de 2019.

- INIA. (2022). Estación, Banco de datos agroclimáticos 1965–2018. Estación Treinta y Tres, Uruguay. Disponible en: <http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico> [último acceso mayo, 2023].
- MVOTMA, 2017. Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos (Treinta y Tres). Disponible en <http://www.mvotma.gub.uy>. Último acceso: 12 de abril del 2017.
- Panario, D., & Gutiérrez, O. (2007). La política forestal industrial del estado uruguayo. *Política y Pasteras en el Rio Uruguay: Medio Ambiente, Modelos Productivos y Movimiento Social*, 1-9.
- SNAP. 2010. Plan de Manejo Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos. Proyecto Fortalecimiento del Proceso de Implementación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (URU/05/001). Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/comunicacion/publicaciones/plan-manejo-paisaje-prottegido-quebrada-cuervos-sierras-del-yerbal>. [último acceso, mayo 2022].
- Rodríguez-Gallego (2008a). Informe 7b. Vida Silvestre - Proyecto SNAP.

ANEXO III

S- METOLACLORO

El S-metolacloro ((S)-2-cloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-(2-metoxi-1-metiletil) acetamida; CAS 8738-12-9) (PAN Pesticide Database, 2022), es un herbicida selectivo del grupo químico de las cloroacetamidas, cuya formula química es C₁₅H₂₂ClNO₂ (Lewis et al., 2016). Es un isómero resuelto del Metolacloro. Este último está compuesto por un par de isómeros R y un par de isómeros S (proporción 50:50) (Shane *et al.*, 2006); en cambio el S-metolacloro contiene una mezcla de los isómeros S y R en una proporción de 88:12 (Lewis et al., 2016). Estudios previos han demostrado que los isómeros S son responsables de la mayor parte de la actividad herbicida del Metolacloro (Moser *et al.*, 1983; Shaner *et al.*, 2006). Por este motivo el S-metolacloro incrementa su capacidad herbicida. Este es absorbido por raíces y brotes; y tiene efectos inhibitorios de la división y el crecimiento celular (Vallotton *et al.*, 2008; Lewis et al., 2016). Se utiliza para el control de gramíneas y malezas de hoja ancha en diversos tipos de cultivos (ej. maíz, soja, girasol, árboles frutales, etc.) (Lewis et al., 2016). Presenta un alto potencial de bioacumulación (LOW *kow*=3.05), es moderadamente móvil en el ambiente; tiene una baja volatilidad; y su solubilidad en agua (480 mg/l – 1) y persistencia en suelo es moderada (Lewis *et al.*, 2016; Observatorio Ambiental Nacional, 2022), lo cual favorece su escorrentía hacia cuerpos de agua superficiales. Además, por su alto potencial de lixiviación; es considerado un importante contaminante de aguas subterráneas (PAN Pesticide Database, 2022), con un tiempo de degradación que se encuentra entre los 500-1000 días en aguas subterráneas (Manual de Plaguicidas de Centroamérica, 2022). En este sentido, se ha detectado la presencia de S-Metolacloro en aguas subterráneas y superficiales de varios países europeos y de varias regiones agrícolas de Estados Unidos (Manual de Plaguicidas de Centroamérica, 2022). En suelo el SM se degrada por acción microbiana a dos metabolitos principales, los ácidos metolacloroetanosulfónico y metolaclorooxanílico (Zemolin *et al.*, 2014). Según Sidoli *et al.*, 2016; estos metabolitos son móviles y persistentes en el ambiente.

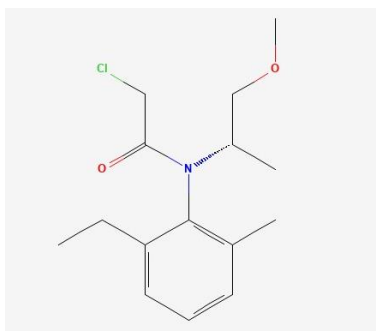


Figura 1. Estructura química del S-metolacloro. Imagen extraída y modificada de National Center for Biotechnology Information (2023).

El GSH (Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos), desarrollado por las Naciones Unidas; en sus declaraciones de peligro, advierte que el S-Metolacloro representa un peligro para el medio ambiente acuático a corto y a largo plazo (categorías H400 y H410), ya que es muy tóxico para los organismos acuáticos y puede provocar efectos nocivos duraderos (National Center for Biotechnology Information, 2022). A nivel de salud humana, el GSH plantea que este herbicida puede provocar reacciones alérgicas e irritación en la piel (categoría H317); y, además, está catalogado como un posible carcinógeno para el ser humano (Lewis *et al.*, 2016; PAN Pesticide Database, 2022).

Los efectos del S-metolacloro se evaluaron sobre distintos organismos acuáticos como el pez cebra (*Danio rerio*) (Quintaneiro *et al.*, 2017; Rozmánková *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022); el cangrejo de río *Procambarus virginalis* (Velisek *et al.*, 2019; Stara *et al.*, 2019); el crustáceo planctónico *Daphnia magna* (Liu *et al.*, 2006); y el molusco bivalvo *Crassostrea gigas* (Mai *et al.*, 2013). En anfibios se han estudiado el potencial de disrupción endócrina del Metolacloro en *Rana pipiens* y *Rana clamitans*, de áreas de agricultura intensiva (McDaniel *et al.*, 2008); los efectos embriotóxicos, de desarrollo y teratogénicos de herbicidas de cloroacetamidas (incluido el Metolacloro) en la especie *Xenopus laevis* (Osano *et al.*, 2002); y también se ha evaluado la toxicidad aguda y sub-aguda del Metolacloro en *Rana Catesbeiana* (Wan *et al.*, 2006). No obstante, los trabajos donde se evalúan los efectos específicos del S-metolacloro sobre las primeras etapas de vida de los anfibios son escasos. En este sentido, se han evaluado los efectos crónicos del S-metolacloro sobre larvas de tres especies de anuros: *Bufo americanus*, *Pseudacris triseriata* e *Hyla versicolor* (Williams *et al.*, 2010); las alteraciones producidas por el herbicida Dual Gold 960EC (cuyo principio activo es el S-metolacloro) sobre adultos de *Pelophylax ridibundus* (Paunescu *et al.*, 2018); así como los efectos provocados por el S-metolacloro en embriones de *Pelophylax perezi* (Quintaneiro *et al.*, 2018). Adicionalmente existen trabajos disponibles en la literatura sobre los efectos tóxicos del S-metolacloro en organismos terrestres como los gusanos de seda *Bombyx mori* L. (Zhan *et al.*, 2006); y los lagartos machos y hembras de la especie *Eremias argus* expuestos a suelos contaminados (Chen *et al.*, 2017). Finalmente, el efecto genotóxico y citotóxico del S-metolacloro también se ha evaluado en células del hepatoma humano (Nikoloff *et al.*, 2013).

En Uruguay, la cantidad de Kg de activo de S-metolacloro importado paso de 222336 kg en 2014 a 538369 kg en 2020, con 1243741 kg totales importados durante este período (Observatorio Ambiental Nacional, 2022). En el país, este herbicida se utiliza principalmente en los cultivos de barbecho; soja, eucaliptus, maíz, sorgo, y maní. Los estudios vinculados con los efectos de este herbicida sobre organismos no blanco

cobran especial relevancia si tenemos en cuenta que se encuentra catalogado como un plaguicida prioritario para la gestión ambiental en Uruguay (Criterio de importancia nº3 – muy importante) (Observatorio Ambiental Nacional, 2022). No obstante, no existen en el país trabajos que evalúen los posibles efectos tóxicos del herbicida S-metolachloro sobre organismos acuáticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Atwood, D., & Paisley-Jones, C. (2017). Pesticides industry sales and usage: 2008–2012 market estimates. *US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 20460*, 2017-01. Disponible en: https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf.
- Chen, L., Wang, D., Tian, Z., Di, S., Zhang, W., Wang, F., ... & Diao, J. (2017). Comparative toxic responses of male and female lizards (*Eremias argus*) exposed to (S)-metolachlor-contaminated soil. *Environmental Pollution*, 227, 476-483.
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D. and Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. DOI: 10.1080/10807039.2015.1133242. Disponible en: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/1027.htm>. Último acceso: 29 de noviembre 2022.
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., & Liu, W. (2006). A comparative study of rac-and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(3), 451-455.
- Liu, S., Wang, L., Chen, K., Yang, H., Ling, M., Wu, L., ... & Bai, L. (2022). Combined effects of S-metolachlor and benoxacor on embryo development in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 238, 113565.
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., & Cachot, J. (2013). Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 89, 1-8.
- Manual de Plaguicidas de Centroamérica (2022). Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Universidad Nacional de Costa Rica. Último acceso: 24 de noviembre 2022. Disponible en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/388-metolachlor>.
- McDaniel, T. V., Martin, P. A., Struger, J., Sherry, J., Marvin, C. H., McMaster, M. E., ... & Tetreault, G. (2008). Potential endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) from areas of intensive row crop agriculture. *Aquatic Toxicology*, 88(4), 230-242.
- Moser, H., Rihs, G., Sauter, H. P., & Böhner, B. 1983. Atropisomerism, chiral centre and activity of metolachlor. In *Pesticide Chemistry: Human Welfare and Environment* (pp. 315-320). Pergamon.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 11140605, S-Metolachlor. Retrieved November 18, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/S-Metolachlor>.

- Nikoloff, N., Escobar, L., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2013). Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and chemical toxicology*, 62, 777-781.
- Observatorio Ambiental Nacional. (2022). Datos abiertos. Datos propios y de otras instituciones vinculadas a la gestión ambiental. Ministerio de Ambiente. Montevideo, Uruguay. Último acceso: 24 de noviembre 2022. Disponible en: <https://www.ambiente.gub.uy/oan/datos-abiertos/>.
- Osano, O., Admiraal, W., & Otieno, D. (2002). Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(2), 375-379.
- PAN Pesticide Database. (2022). Metolachlor, (S). Pesticide Action Network, North America. Último acceso: 24 de noviembre 2022. Disponible en: <https://www.pesticideinfo.org/chemical/PRI4201>.
- Paunescu, A., Soare, L. C., Fierascu, R. C., Fierascu, I., & Ponopal, M. C. (2018). The influence of six pesticides on physiological indices of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 100(3), 376-383.
- Quintaneiro, C., Patrício, D., Novais, S. C., Soares, A. M. V. M., & Monteiro, M. S. (2017). Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos. *Science of the Total Environment*, 586, 390-400.
- Quintaneiro, C., Soares, A. M., & Monteiro, M. S. (2018). Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. *Chemosphere*, 194, 595-601.
- Rozmánková, E., Pípal, M., Bláhová, L., Chandran, N. N., Morin, B., Gonzalez, P., & Bláha, L. (2020). Environmentally relevant mixture of S-metolachlor and its two metabolites affects thyroid metabolism in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 221, 105444.
- Shaner, D. L., Brunk, G., Belles, D., Westra, P., & Nissen, S. (2006). Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(7), 617-623.
- Sidoli, P., Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., & Baran, N. (2016). Experimental and modeling of the unsaturated transports of S-metolachlor and its metabolites in glaciofluvial vadose zone solids. *Journal of Contaminant Hydrology*, 190, 1-14.
- Stara, A., Kubec, J., Zuskova, E., Buric, M., Faggio, C., Kouba, A., & Velisek, J. (2019). Effects of S-metolachlor and its degradation product metolachlor OA on marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). *Chemosphere*, 224, 616-625.
- Vallotton, N., Moser, D., Eggen, R. I., Junghans, M., & Chèvre, N. (2008). S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere*, 73(3): 395-400.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Kubec, J., Buric, M., & Kouba, A. (2019). Effects of s-metolachlor on early life stages of marbled crayfish. *Pesticide biochemistry and physiology*, 153, 87-94.
- Wan, M. T., Buday, C., Schroeder, G., Kuo, J., & Pasternak, J. (2006). Toxicity to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus*

- tshawytscha, and *Rana catesbeiana* of atrazine, metolachlor, simazine, and their formulated products. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 76(1), 52-58.
- Williams, B. K., & Semlitsch, R. D. (2010). Larval responses of three Midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58:819-827.
- Yang, L., Ivantsova, E., Souders II, C. L., & Martyniuk, C. J. (2021). The agrochemical S-metolachlor disrupts molecular mediators and morphology of the swim bladder: implications for locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111641.
- Zemolin, C. R., Avila, L. A., Cassol, G. V., Massey, J. H., & Camargo, E. R. (2014). Environmental fate of S-Metolachlor: a review. *Planta daninha*, 32, 655-664.
- Zhan, X. M., Liu, H. J., Miao, Y. G., & Liu, W. P. (2006). A comparative study of rac-and S-metolachlor on some activities and metabolism of silkworm, *Bombyx mori* L. *Pesticide biochemistry and physiology*, 85:133-138.