

**PLAN DE MONITOREO AMBIENTAL PARA EL ESTUDIO DEL
IMPACTO DE CULTIVOS EXTENSIVOS DE ARROZ SOBRE EL
MACROSISTEMA IBERÁ**

Septiembre de 2008

Rafael Lajmanovich & Paola Peltzer

Cátedra de Ecotoxicología

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral-CONICET

Propuesta realizada a solicitud de la Intendencia de Colonia Pellegrini (Corrientes
Argentina).

Colaborador:

Andrés M. Attademo

Índice

	Pág.
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
<i>Generalidades</i>	4
<i>Áreas de drenaje: problemática de las arroceras</i>	5
<i>Valoración ecotoxicológica-ambiental de los cultivos de arroz</i>	6
JUSTIFICACION DE LOS ESTUDIOS PROPUESTOS	9
<i>Indicadores biológicos en la evaluación de la contaminación ambiental</i>	9
<i>Ecotoxicología de los Agroquímicos: impacto de las actividades agrícolas sobre la fauna silvestre del Litoral de Argentina</i>	11
METODOLOGIA	16
1- COMPONENTE: Residuos de Contaminantes	17
2- COMPONENTE: Biomarcadores	18
3- COMPONENTE: Eutrofización de Ambientes Acuáticos	20
4- COMPONENTE: Biensayos, Valoración Ecotoxicológica	23
Referencias.....	27
ANEXO I	34
Uso de Agroquímicos y la Salud del Trabajador Rural.....	34

RESUMEN

Diversos programas de monitorización sobre la calidad de las aguas, llevados a cabo en terrenos destinados al cultivo de arroz, han demostrado que *“la presencia de plaguicidas es comparativamente superior en aguas de drenaje que en las utilizadas para riego, coincidiendo los incrementos con el calendario de aplicaciones”*. En consecuencia, el cultivo de arroz, en la periferia del Iberá, es una actividad de alto impacto en donde el agua vertida es probablemente un vehículo de transporte de biocidas hacia los humedales asociados. Es por esto, que un aspecto relevante a considerar de la reserva sería la cercanía de las arroceras a las áreas donde se encuentran las especies silvestres. Es de suponer que gran parte de las poblaciones se trasladen, desde éstas hacia la reserva y viceversa, y de esta manera, se pongan en contacto con los agroquímicos. Esta situación genera riesgo ecológico a las comunidades del área; en consecuencia, surge la necesidad de acciones urgentes como el establecimiento de áreas *buffer*, o de amortiguamiento adecuadas, que minimicen la potencial contaminación.

Asimismo, una de las premisas más importantes de la bioevaluación o biomonitoreo es que *“los esquemas físico-químicos no son capaces de detectar los daños en las comunidades biológicas”*. En cambio, los biomonitoreos pueden distinguir impactos o efectos futuros y presentes que estén enmascarados, tales como nuevas sustancias tóxicas que han ingresado al ambiente, sinergia entre sustancias (Ej. entre varios agroquímicos) o posibles cambios en las propiedades físico-químicas de las mismas. Otra ventaja, es que pueden ser estudiadas las modificaciones o alteraciones a largo plazo sobre todo el ecosistema (especies, poblaciones y comunidades). Por estas razones es importante incorporar, a los métodos de evaluación de la calidad ambiental y de la integridad de los ecosistemas, herramientas bioanalíticas como los indicadores biológicos que complementen a los métodos tradicionales.

Tomando en cuenta lo explicado, la complejidad estructural y funcional de los ecosistemas del Iberá requiere de investigaciones para seleccionar a las especies clave y mejorar el conocimiento de los bioindicadores, como un procedimiento que establezca el efecto de los agroquímicos utilizados en los cultivos de arroz. Otra necesidad prioritaria son las evaluaciones adicionales que permitan establecer, con mayor precisión, el efecto tóxico de las sustancias químicas en los procesos ecológicos y sobre la salud de las poblaciones humanas. Es por esto, que el presente *PLAN DE MONITOREO AMBIENTAL PARA EL ESTUDIO DEL IMPACTO DE CULTIVOS EXTENSIVOS DE ARROZ SOBRE EL MACROSISTEMA IBERÁ* propone evaluar los siguientes componentes: Residuos de contaminantes en grasa de animales silvestres; Biomarcadores: colinesterasa plasmática, reactivación *in vitro* y test de los micronúcleos; Eutrofización de Ambientes Acuáticos: medición de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos; Biensayos de Valoración Ecotoxicológica, con muestras de agua y sedimentos provenientes de las arroceras: ensayo de reproducción (*Daphnia magna*), ensayo de inhibición del crecimiento (*Chlorella vulgaris* y *Lactuca sativa*) y ensayo de supervivencia con *P. anagrellus redivivus* (nematodo). Además, a través de mediciones de rutina para la exposición de poblaciones humanas a plaguicidas (colinesterasa plasmática, ensayo del cometa, test de aberraciones cromosómicas en linfocitos y frecuencia de células apoptóticas) considerar a los trabajadores rurales de las arroceras (expuestos a multitud de productos químicos agropecuarios, en forma de mezclas complejas) y a los pobladores potencialmente expuestos.

INTRODUCCIÓN

Generalidades:

Al considerar la “*Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar*” (RAMSAR, 2002), el denominado “Macrosistema Iberá” forma una compleja asociación de ambientes leníticos y lóticos que ocupa extensas superficies de la provincia de Corrientes (Argentina). Los humedales más destacables corresponden a lagunas de diversas superficies dispuestas a lo largo del eje mayor de la cuenca. Estos cuerpos de agua se articulan entre sí, y con los esteros, a través de canales de variado desarrollo, para finalmente resolverse en un difuso sistema de avenamiento en las nacientes del río Corriente. El sistema se ubica a 118 km al N-NE de la ciudad de Mercedes, cabecera del departamento homónimo. Dentro del mismo sitio, a la margen de la Laguna del Iberá, se encuentra el pueblo denominado Colonia Carlos Pellegrini de unos 500 habitantes, que pertenece al Departamento San Martín. En el área confluyen tres Departamentos provinciales: Ituzaingó, Mercedes y San Martín y corresponde a una planicie con pendiente muy escasa (ligeramente superior al 1 por 1.000) en sentido NE a SW. La cuenca se desarrolla sobre un basamento de arenas fluviales correspondiente al Plioceno Superior-Pleistoceno Inferior (Canevari y col., 1999). El mayor valor biofísico e hidrológico del “Macrosistema Iberá”, lo constituye su dinámica hídrica en relación con el flujo de nutrientes. Estos esteros son, en sí mismos, una reserva potencial de nutrientes que son liberados parcial y paulatinamente para ser reciclados. Esto resulta muy importante para un sistema biótico que se encuentra asentado en arenas que han sido lixiviadas durante un gran tiempo, puesto que el mismo actuaría como una trampa de nutrientes, retardando su exportación. El microsistema presenta un clima subtropical húmedo. La temperatura media anual es de 21-22 °C. Las medias pluviométricas son de 1200 a 1800 mm/año, con frecuencia y concentración superior en el verano y otoño; siendo los meses más secos junio y julio

Desde el punto de vista de la biodiversidad, uno de los inventarios más completo del sitio fue realizado por la Universidad Nacional del Nordeste (Álvarez, 2003); en este estudio se citan 45 especies de anfibios y aproximadamente 35 especies de reptiles. Entre los que se incluyen el yacaré negro (*Caiman yacare*), el yacaré overo (*Caiman latirostris*) y la iguana overa (*Tupinambis merianae*). Giraud (2003) presenta una importante investigación sobre la avifauna del Iberá, en la cual se citan 343 (que corresponden al 70,5% de las aves de Corrientes y al 34,5% de las aves de la Argentina). De este total, 342 son aves autóctonas y la mayor parte (88%) de linaje paranaense. Una revisión de todos estos antecedentes (Parera, 2004), destaca una fauna de vertebrados que se compone de 624 especies: 125 peces y 499 vertebrados tetrápodos (40 anfibios, 59 reptiles, 343 aves y 57 mamíferos). Además, el Iberá es la mayor reserva Argentina del ciervo de los pantanos y uno de los últimos relictos para el venado de las pampas. Se encuentran enormes concentraciones de carpinchos,

lobitos de río, curiyúes y yacarés, que le otorgan a estos ambientes una fisonomía “única”. Se hallan unas 1.659 especies de plantas vasculares (Arbo y Tressens, 2002), destacándose formas acuáticas, palustres y embalsados. Éstos últimos, ocupan una superficie importante, se trata de un pirizal flotante, fundamentalmente constituido por *Cyperus giganteum*, entre otras especies o comunidades, que crecen sobre un manto de residuos orgánicos que pueden superar los 150 cm de espesor (Alvarez, 2003; Parera, 2004). Asimismo, se han realizado estudios sobre las comunidades de artrópodos que registraron 17 ordenes (Bar y col., 2004). Considerada globalmente, la mayor parte de la biota del Iberá se encuentra en el sector húmedo y subhúmedo del gradiente topográfico, sin registrarse especies endémicas (Neiff y Poi de Neiff, 2006).

Áreas de drenaje: problemática de las arroceras:

Históricamente, los esteros del Iberá han sido considerados como fuente ilimitada y gratuita de agua para los emprendimientos arroceros (Parera, 2004). Es de destacar que todos los cultivos de arroz del sistema (desde Galarza a Colonia Pellegrini) se irrigan mediante canales “baletones” abiertos artificialmente. El destino final de esas aguas, efluentes del cultivo, *con su carga de agroquímicos*, sigue siendo motivo de discusión y representa un aspecto importante a monitorear, así como su bioacumulación y biomagnificación en la fauna del lugar (Canziani y col., 2003). Por otra parte, se subraya la importante transformación producida en el Norte del Iberá (a lo largo de la ruta provincial 41, desde su intersección con la ruta 40 al Sur de Galarza, hasta la ruta nacional 12, y desde allí de manera intermitente hacia Villa Olivari). Esta transformación se caracteriza por la construcción de canales y movimientos de tierra tendientes a facilitar el drenaje y escurrimiento de malezales y fofadales, con el objeto de habilitar tierras a la producción, principalmente promovida por la irrupción de la actividad forestal a fines de los años '90. El impacto de estas obras, estaría comprometiendo el destino de las últimas poblaciones de venado de las pampas en la Argentina (Parera y Moreno, 2000).

En la cuenca del río Corrientes se cultivan unas 12.000 ha de arroz que representan el 15% de la superficie de la provincia de Corrientes (Diez Repetto, 2007). La mayoría de las explotaciones se sitúan cercanas a la margen de este río, siendo éste la principal fuente de riego y también de destino de los efluentes provenientes de las arroceras. Además, en la cuenca del río Miriñay unas 24.000 ha son utilizadas para la producción, predominando el riego de represas que captan el escurrimiento de aguas superficiales. Conjuntamente con el arroz, en esta zona también se siembran unas 7.000 ha de otros cultivos extensivos como soja, maíz, sorgo y girasol, por lo que se suman al río los escurrimientos de estas tierras. Mientras que en el sistema de la Reserva Iberá, se encuentran instaladas unas cuatro arroceras con aproximadamente 1.100 ha que representan solo el 1,6% del total provincial. Las arroceras cuyas fuentes de riego son las lagunas Trin y Fernández, presentan la particularidad de concentrar los efluentes de las chacras en el mismo canal de toma, regando con agua que se mezcla con los drenajes propios, conformando un circuito semi-cerrado. Las restantes

arroceras se ubican en la Colonia Carlos Pellegrini y cuentan con la laguna Iberá como fuente de agua de riego (Diez Repetto, 2007), situación que lleva a que este sistema acuático muestre signos de eutrofización, probablemente por los aportes de nutrientes ligados a éste cultivo, que aumentó en un 312% desde 1990 hasta 1999 en la provincia en general (Canziani y col., 2003). Estos mismos autores identificaron a la producción de arroz, como la principal potencial causa de contaminación por plaguicidas del agua en los Esteros; al mismo tiempo algunas concentraciones de metales disueltos (cromo) eran más elevadas en las áreas que están conectadas con la actividad agrícola.

Sin lugar a dudas, la siembra de arroz, en la periferia del Iberá, es una actividad de alto impacto debido a la sistematización hidráulica del terreno para favorecer la inundación del suelo, a la roturación periódica de la tierra, por la extracción de agua de las lagunas, y la incorporación de agroquímicos a los esteros y las lagunas por efecto de las lluvias (*runnoff*). Uno de los principales inconvenientes derivaría de la falta de acciones de restauración ecológica de los campos, luego de ser abandonados, al reducir la rentabilidad por la pérdida de fertilidad (Neiff y Poi de Neiff, 2006).

Valoración ecotoxicológica-ambiental de los cultivos de arroz:

Durante las dos últimas décadas los esfuerzos para prevenir el deterioro de la calidad de aguas superficiales, se han centrado principalmente en el seguimiento y control de las fuentes puntuales de contaminación (e.g.: vertidos industriales, urbanos, etc.), prestándose una menor atención a las de origen difuso, ya que estas últimas son difíciles de identificar y cuantificar. Las principales fuentes de contaminación de este tipo, se han relacionado con actividades agrarias, entre las que destaca la aplicación de productos fitosanitarios para el control de plagas y malezas en los cultivos (Pereira y Hostettler, 1993), ya que supone la emisión de grandes cantidades de agentes contaminantes. Las prácticas agrícolas condicionan, en parte, las rutas por las que herbicidas, insecticidas y funguicidas pueden alcanzar aguas superficiales. El caso del cultivo de arroz es excepcional por ser el único que se realiza en condiciones de inundación del terreno, de tal manera que se mantiene parcialmente sumergido mediante irrigación. Los campos se comunican a través de canales de riego y de drenaje conectándose estos últimos con cauces, lagos u otras masas de aguas superficiales cercanas. Programas de monitorización sobre calidad de aguas, llevados a cabo en arrozales, han demostrado que *“la presencia de plaguicidas es comparativamente superior en aguas de drenaje que en las utilizadas para riego, coincidiendo los incrementos con el calendario de aplicaciones”* (Iwakuma y col., 1993; Bhuiyan y Castañeda, 1995). Esta situación permitió concluir que *“el agua de drenaje es un vehículo de transporte de plaguicidas hacia aguas conectadas con plantaciones de arroz y que esta práctica constituye una fuente directa de contaminación acuática”* (Abdullah y col., 1997; Coupe y col., 1998).

La combinación de metodologías químicas y biológicas, entre estas últimas el empleo de bioensayos, con muestras de agua procedentes de canales de drenaje, permitieron relacionar episodios de mortandades y sucesivo descenso de poblaciones de peces con la aplicación de plaguicidas en plantaciones de arroz próximas al delta de los ríos Sacramento y San Joaquín (USA) (FAO 2005). El uso de bioensayos con muestras de agua procedentes de arrozales y de cauces receptores ha sido empleado por otros autores (Takamura y col., 1991; Korth y col., 1995; Shigehisa y Shiraishi, 1998), demostrando la capacidad de estos métodos para predecir efectos ecotoxicológicos asociados a las descargas de plaguicidas desde los canales de drenaje.

Si se considera como marco un contexto sumamente problemático y cuestionado, la Asociación Correntina de Plantadores de Arroz (ACPA), en el año 2006, firmó un convenio con el Instituto Correntino del Agua y del Ambiente (ICAA) con la finalidad de llevar a cabo un programa de trabajo en el que se incluyó el estudio de dos indicadores ambientales: Riesgos de Contaminación por Pesticidas y Riesgos de Contaminación por Fertilizantes (ICAA – ACPA, 2007). El principal objetivo del programa, fue evaluar la dinámica de los agroquímicos utilizados en los cultivos de arroz y su efecto en el ambiente a lo largo de dos campañas arroceras: 2006/07 y 2007/08. Para tal fin, se tomaron muestras de agua, sedimentos, suelo y grano en distintos puntos de la cuenca. Este informe concluyó, en forma preliminar, que los valores de los parámetros estudiados resultan compatibles con los niveles guía para actividades agropecuarias y que no se detectó presencia alguna de agroquímicos. Al respecto, a manera de breve comentario, cabe mencionar que faltarían considerar otros compartimentos (o matrices a evaluar) y metodologías; como lo serían los estudios de aguas-sedimentos (a través de bioensayos) y fundamentalmente la posible presencia de residuos de plaguicidas en muestras de tejido animal (Ej., grasa, gónadas, etc.). Además, de la utilización de herramientas usuales para el estudio de riesgo ecológico como lo son los bioindicadores y los biomarcadores.

Según lo explicado anteriormente, el problema de la contaminación de aguas ha adquirido una nueva dimensión si consideramos que muchas de las sustancias químicas vertidas al medio terminan asociándose de manera reversible a los sedimentos. Desde esta perspectiva, la contaminación de estos y los efectos sobre la fauna asociada se convierten en problemas que requieren del desarrollo de herramientas específicas. En este sentido, los primeros esfuerzos orientados recomiendan por un lado el desarrollo de metodologías para la determinación de la concentración de compuestos asociados a sedimentos y de su distribución entre la columna de agua y el fondo (dinámica de sorción/desorción hasta el equilibrio); y por otro lado, la utilización de bioensayos con organismos bentónicos con el fin de valorar con mayor fiabilidad la toxicidad de compuestos asociados a los mismos (Dickson y col., 1987).

Asimismo, se debe recordar que la utilización de plaguicidas para el cultivo del arroz, supone un riesgo en campos cercanos a diversos humedales de gran valor ecológico (como se ha demostrado en los Parques Naturales de la Albufera de Valencia y el Delta del Ebro (Tarragona-España) (Peña Llopis, 2003). Estos plaguicidas disminuyen y oxidan los niveles del antioxidante intracelular importante, como el glutatión (GSH). Así, se ha descubierto que el principal mecanismo de toxicidad de los herbicidas tiocarbamatos es la generación de radicales libres, produciendo un estado de estrés oxidativo, que sería responsable de la anemia hemorrágica observada en anguilas. Además, la tolerancia de las anguilas a los plaguicidas estaría mediada principalmente por la capacidad de mantener e incrementar el estado redox del glutatión. Una excesiva oxidación de éste produciría estrés oxidativo que conduciría, según la intensidad, a una muerte celular programada (apoptosis) o necrosis, resultando en una disfunción de los tejidos y finalmente, la muerte del organismo. Un patrón similar también se encontró en una población natural de la semilla del pectínido *Flexopecten flexuosus*, al igual que el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) cultivado en el Delta del Ebro, que está expuesto a una variación estacional de plaguicidas, siendo el insecticida órganofosforado fenitrotión el más abundante. Otros estudios realizados en arrozceras (Gutiérrez-Tórriz, 2004), detectaron residuos de Malatión (13.2 ng/lt.), un insecticida órganofosforado de baja persistencia en agua y utilizado en este cultivo de forma habitual.

Un caso emblemático, ocurrido en La Cuenca de la Laguna Merín en el vecino país de Uruguay, zona muy rica en biodiversidad, especialmente en sus bañados asociados (Chiappe y Piñeiro, 2002). Con la expansión del arroz sobrevino la pérdida de humedales originales por secado directo y se produjeron cambios en el régimen hidrológico de la región, debido a los sistemas de irrigación por bombeo, la construcción de represas en las partes altas de la cuenca para el riego por desnivel, y las obras de drenaje efectuadas en las tierras bajas ocupadas por bañados. En este, como en otros casos, los actores sociales privados (cultivadores, molinos y propietarios de las tierras) tuvieron un papel preponderante en la expansión arrozera sobre zonas ambientalmente valiosas y/o frágiles. Estos han sido, a su vez, apoyados por el Estado que realizó o respaldó obras de infraestructura, sobre todo durante el gobierno de facto (Scarlato, 1993). Una investigación del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) detectó residuos de plaguicidas utilizados para el cultivo de arroz, en muestras de suelos y aguas, en períodos inmediatos a su aplicación, pero se comprobó su disminución o desaparición en extracciones sucesivas (Convenio INIA-LATU, 1996). No obstante esto, la degradación de hábitat fue uno de los factores más importante.

Entre los principales impactos del cultivo de arroz sobre el humedal del Iberá se pueden mencionar, basándose en la obra de Neiff (2004) a: 1. la sustitución de un paisaje natural (pasturas hidrófilas o mesófitas) por un monocultivo; 2. la rotura y alisado del suelo; 3. la utilización de herbicidas de pre-emergencia; 4. el agregado de fertilizantes; 5. el uso de productos fitosanitarios que producen efectos sobre los procesos de mineralización de la materia orgánica y menor actividad de

los micro-organismos, que a su vez, es compensado con agregado de más fertilizantes; 6. la utilización (mediante bombeo) de gran cantidad de agua, proveniente del humedal, en donde se ha constatado que se succionan larvas de peces y alevinos, produciéndose un gran impacto sobre las poblaciones ictícolas; la aparición de especies invasoras del cultivo de arroz (patos, otras aves granívoras, ratones, etc.) que también son combatidas con distintos arsenales químicos. En resumen, la adición de gran cantidad y variedad de agroquímicos producen disturbios por eutrofización y contaminación de los lagos y bañados.

Por otra parte, y en contraste con otros tipos de producción agropecuaria, los cultivos de arroz contienen una importante diversidad biológica (ver, Chandrasena, 1988; Bambaradeniya y col., 1998; 2004). Particularmente, recientes estudios realizados en campos de arroz ubicados al sur de Corrientes capital (Duré y col., 2008) encontraron 26 especies de anfibios anuros (aproximadamente el 50 % de las conocidas para la provincia) habitando cinco microhábitats: campos de arroz, zanjas y caminos, barrancas, vegetación acuática y vegetación natural, indicándose a éste último, como el más diverso. Es por esto, que un aspecto relevante a considerar de la Reserva Iberá sería la cercanía de las arroceras a las áreas donde se encuentran las especies silvestres. Es de suponer que gran parte de las poblaciones se trasladen, desde éstas hacia la reserva y viceversa, y de esta manera, se pongan en contacto con los agroquímicos, situación que sin lugar a duda impacta negativamente en las comunidades del área. En consecuencia, sería imperioso el establecimiento de áreas *buffer*, o de amortiguamiento adecuadas, que minimicen la potencial contaminación.

JUSTIFICACION DE LOS ESTUDIOS PROPUESTOS

Indicadores biológicos en la evaluación de la contaminación ambiental:

La evaluación de la calidad del ambiente, en particular de las comunidades acuáticas, ha sido tradicionalmente, desarrollada en base a métodos y determinaciones de las características físico-químicas del agua (incluyendo la detección de residuos de plaguicidas). No obstante esto, en la actualidad se han desarrollado diversas técnicas para evaluar los efectos que traen consigo las variadas actividades antropogénicas (dentro de las que se incluyen las prácticas agrícolas) que presentan un impacto probable en la salud humana y en el ecosistema. La respuesta de los organismos en distintas escalas, desde biomarcadores hasta comunidades, es ahora una alternativa y un complemento en la evaluación de la calidad del ambiente. Los denominados "marcadores" detectan efectos biológicos de los contaminantes sobre los organismos vivos (Livingstone, 1993). Sin embargo, la mayoría de los actuales autores sugieren que existe un desconocimiento de las interacciones causales entre la contaminación ambiental y la respuesta biológica (Livingstone, 1993; Bucheli y Fent, 1995; Depledge y col., 1995; Melacon, 1995; Capó, 2002; de Acevedo y da Mata,

2003). Es por esto, que las herramientas convencionales para monitoreo ambiental pueden evaluar los niveles de contaminantes y el estado de salud ambiental, pero no la interrelación entre ambos, mientras que el uso de biomarcadores puede relacionar causa y efecto (Bucheli y Fent, 1995; Capó, 2002).

Las consecuencias de las sustancias tóxicas sobre un ecosistema se inician con una reacción bioquímica en el individuo. Esta respuesta inicial ocurre en los niveles de organización biológica más bajos y es altamente reversible y específica. A partir de esto, con el incremento del impacto, comienza una sucesión de alteraciones dentro de los niveles más complejos, llevando a la perturbación de las funciones vitales y/o a la muerte del organismo. En estas circunstancias, los efectos pueden aparecer a nivel poblacional y eventualmente, en el ecosistema. Así, los biomarcadores pueden ser definidos a cualquier nivel de organización biológica (Bucheli y Fent, 1995). La sensibilidad, especificidad y precisión del biomarcador suelen disminuir al incrementar el nivel de organización, mientras que la relevancia ecológica se incrementa (Adams y col., 1989). Las ventajas de los biomarcadores para el monitoreo biológico han sido discutidas ampliamente en la literatura (Livingstone, 1993; Bucheli y Fent, 1995; Melacon, 1995; Capó, 2002; Suk y Wilson, 2002; de Acevedo y da Mata, 2003). Sus dos características más importantes son: 1) la identificación de las interacciones entre el contaminante y el organismo, y 2) la medición de efectos sub-letales. Es sabido que, por análisis químicos solo puede medirse una fracción de los contaminantes presentes, sin evidenciar los efectos adversos. Por el contrario, los biomarcadores, por su parte, también pueden indicar la presencia de contaminantes y sus efectos. La sub-letalidad y detección de alteraciones tempranas conduce a acciones de prevención y/o remediación (Livingstone, 1993).

Una de las premisas más importantes de la bioevaluación o biomonitoreo es la de que *“los esquemas físico-químicos no son capaces de detectar los daños en las comunidades biológicas”* (Badii Zabeh y col., 2005). No obstante, los biomonitoreos pueden distinguir impactos o efectos futuros y presentes que estén enmascarados, tales como nuevas sustancias tóxicas que han ingresado al ambiente, sinergia entre sustancias (e.g. entre varios plaguicidas) o posibles cambios en las propiedades físico-química de los mismos. Otra ventaja es que pueden ser estudiados los cambios o alteraciones a largo plazo sobre todo el ecosistema (especies, poblaciones y comunidades). Por estas razones es importante incorporar, a los métodos de evaluación de la calidad ambiental y de la integridad de los ecosistemas, mecanismos como los indicadores biológicos que complementen a los métodos tradicionales.

Tomando en cuenta lo explicado, la complejidad estructural y funcional de los ecosistemas del Iberá requiere de mayor investigación para seleccionar a las especies clave y mejorar el conocimiento de los bioindicadores, como una herramienta que permita identificar los efectos de los agroquímicos utilizados en los cultivos de arroz, sobre las comunidades. Otra necesidad prioritaria son los estudios

adicionales, que permitan establecer una mayor precisión sobre la toxicidad de estas sustancias químicas en los procesos ecológicos y sobre la salud de las poblaciones humanas.

Ecotoxicología de los Agroquímicos: impacto de las actividades agrícolas sobre la fauna silvestre del Litoral de Argentina:

Distintos trabajos han verificado el impacto de las actividades agrícolas sobre la fauna de vertebrados, particularmente en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos (Lajmanovich y col., 2004; 2005a; Peltzer y col., 2003; 2004). De estos estudios, caben mencionar los realizados en áreas donde se cultiva arroz en la Provincia de Santa Fe (Attademo y col., 2007). A su vez, se ha detectado la presencia de residuos de plaguicidas en especies silvestres (Lenardón y Enrique, 1998; Lajmanovich y col., 2002; 2005b). En este sentido, en las últimas décadas y en diversas partes del mundo, se han analizado los residuos de productos órganoclorados en vertebrados terrestres (Culley y Applegate, 1967; Punzó y col., 1979; Alberto y Peña, 1981; Wiktelius y Edwards, 1997; Sparling y col., 2001). En contraste, existe escasa información que documente esta problemática en Sudamérica. Es por esta razón que Allsopp y Erry (2000), en la recopilación sobre los niveles de contaminantes orgánicos persistentes (COP) en América Latina, no aportaron datos sobre anfibios, reptiles y mamíferos terrestres. Los estudios sobre la acumulación de estos xenobióticos son muy importantes, debido a que son de los pocos indicadores directos que se puede tener sobre la exposición de la fauna silvestre en diferentes lugares y poblaciones (Zakrzewski, 1991). Estas investigaciones son necesarias considerando que el contacto de los animales silvestres con los plaguicidas, se da de manera accidental. Una de las dificultades de monitorear los residuos de estos químicos, es la selección de los compuestos a buscar ya que existen más de 100 sustancias comprendidas entre órganoclorados, órganofosforados y carbamatos registrados como ingredientes activos en miles de productos utilizados como agroquímicos (CASAFE, 2003).

Los componentes de mayor importancia para detectar son los compuestos clorados (OC), los cuales tienen un potencial de bioacumulación elevado, afectan la supervivencia de las especies y poseen un peligro potencial para la salud humana (OMS, 1982). El descubrimiento de insecticidas OC como el DDT, que son altamente persistentes, bioacumulables y que pueden afectar poblaciones completas de animales silvestres, ha generado la prohibición y restricciones en su utilización (Ronald y col., 1990). Aparentemente, un plaguicida clorado puede ser encontrado en la fauna y raramente en las personas, debido a la constante exposición a la que están sometidas las especies que habitan en los campos cultivados. Sin embargo, en la provincia de Santa Fe, se ha señalado la presencia de residuos de OC en leche materna (Lenardón y col., 2000). Como la bioacumulación de OC depende de la cantidad de grasas del organismo, los especímenes adultos pueden tener relativamente bajos niveles de plaguicidas y no presentar signos de intoxicación. Puesto que estos compuestos están

almacenados en el tejido adiposo, al movilizar las reservas grasas durante la reproducción o las migraciones, se puede producir la intoxicación de los animales y las crías.

Además, su liposolubilidad les confiere un medio favorable para su conservación y acumulación facilitando los procesos de traslocación a través de las redes tróficas. Es de destacar los niveles detectables de OC que pueden causar la muerte de los individuos dependen de factores ecológicos y fisiológicos, así también de características biogeográficas (Hall y Henry, 1992). Por ejemplo, en un estudio realizado con lagartos del Noroeste de Somalia (Lambert, 1997a), se registraron diferencias interespecíficas en la acumulación de dieldrín, BHC y DDT. La presencia de residuos de OC en grasa fue mayor en lagartos que viven entre rocas (*Hemidactylus parkeri*) y semi-cavadores (*Chalcides ragazzii*, *Mabuya s. striata*) que aquellos de hábitos corredores de arenas (*Pseuderemias smithi*). Asimismo, Fagotti y col., (2005) señaló en forma preliminar diferencias entre las proporciones de OC en tejidos (e.g. piel dorsal y ventral, cerebro, hígado) de *Rana esculenta* y *R. lessoane*, y cuya diferencia se explicaría por los hábitos ecológicos que presenta cada especie (hábitos semiacuáticos vs terrestres). De esta manera, productos como el DDT, dieldrín y endrín persisten por años y son un peligro potencial para los ecosistemas (Kuhr y col., 1974; Allsopp y Erry, 2000; Wiktelius y Edwards, 1997).

A escala regional, entre los residuos detectados en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos (Lajmanovich y col., 2005a) se destaca el endosulfán, que con un rango de 5-39 ng/g, se observó en el 42,1 % de anfibios anuros (*Leptodactylus ocellatus*, *L. chaquensis*, *Hypsiboas pulchellus* y *Chaunus schneideri*) y reptiles (*Phyllodrias patagoniensis*, *Clelia rustica*, *Hydrodinastes gigas* y *Lystrophis dorbignyi*). Este hecho se podría explicar porque en el área estudiada los cultivos de soja son la principal explotación agropecuaria y el endosulfán se utiliza en forma masiva para el control de algunas de sus plagas. Es importante subrayar que para éste agroquímico existen evidencias de su efecto estrogénico (Soto y col., 1994; Arnold y col., 1997) y que Park y col. (2001) demostraron que bajos niveles de endosulfán (5 ppb) interfieren en los mecanismos ferohormonales de anfibios urodelos. Posteriormente, Lajmanovich y col., (2005a) comprobaron su efecto mutagénico para las larvas de anfibios.

Según los niveles de residuos detectados en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos (Lajmanovich y col., 2005a), ninguno de los compuestos alcanza concentraciones asociadas a mortalidades masivas de animales silvestres, aunque resulta evidente que, en cualquier caso, la simple existencia de este tipo de xenobióticos ejerce, como señala Odum (1972), una presión sobre el flujo de energía de los ecosistemas. Del mismo modo, sugerimos que la apreciación del verdadero alcance de los resultados obtenidos requiere de un seguimiento de los niveles de contaminantes y de la evolución de las poblaciones afectadas, de la misma forma que la posible relación de las sustancias xenoestrogénicas advertidas, con el registro de anfibios malformados en la región (Peltzer y col.,

2001; Attademo y col., 2004; Lajmanovich, 2007, inédito). Según la hipótesis de Sower y col., (2000), el incremento en la tasa de malformaciones en anuros podría deberse a la acción de disruptores endocrinos. Con relación a este fenómeno, Ouellet y col. (1997) reportaron una mayor frecuencia de ranas malformadas en poblaciones de sitios agrícolas expuestas a organoclorados como el DDT. De igual forma, estos químicos con actividad estrogénica, están implicados en disfunciones reproductivas y anomalías en el desarrollo de numerosas especies, que incluyen peces y reptiles (Crain y Guillette, 1997). Además, en humanos están señalados como potenciales factores etiológicos en el incremento de casos de cáncer y alteraciones de fertilidad (Carlsen y col., 1995).

A diferencia de los insecticidas organoclorados, los organofosforados (OPs) y carbamatos (CBs) presentan una baja persistencia ambiental (Racke, 1992). La hidrólisis, la fotólisis y la degradación microbiana son los mecanismos más importantes en la destrucción de estas moléculas. A su vez, los organismos cuentan con sistemas de detoxificación capaces de degradar y eliminar los OPs y CBs, como son las enzimas carboxilesterasas y las fosfotriesterasas. Estos mecanismos generan un problema a la hora de evaluar por medio de análisis químicos, los residuos de estos plaguicidas en sus tejidos o en el medio. Esta aparente dificultad puede ser salvada con el empleo de técnicas bioquímicas que permiten determinar el grado de inhibición de las enzimas implicadas en la toxicidad de los OPs y CBs. Recientemente, y con el objetivo de desarrollar sistemas de monitoreo no letales, se ha empleado el análisis de la actividad de la butirilcolinesterasa (BChE) sanguínea para evaluar la exposición de la fauna silvestre a los OPs y CBs (Sánchez-Hernández, 2001). La BChE es abundante en la sangre, presenta propiedades muy similares a la acetilcolinesterasa e incluso llega a ser más sensible que esta última a la acción inhibitoria de los OPs y CBs, al menos en los vertebrados. En muchos trabajos se han empleado los niveles de actividad de la BChE, como indicador del grado de exposición a dichos plaguicidas tanto en organismos acuáticos (Fulton y Key, 2001), como aves (Iko y col., 2003; Hill, 2003) y mamíferos (Sheffield y col., 2001). Dentro de la herpetofauna, recientemente los reptiles han sido un grupo emergente en estudios sobre los efectos tóxicos de los OPs y CBs y el uso de las colinesterasas como biomarcadores bioquímicos de exposición (Sánchez-Hernández y Moreno Sánchez, 2002; Sánchez-Hernández, 2003; Sánchez-Hernández y col., 2004).

En los últimos años, numerosas investigaciones comprobaron el efecto del glifosato (N – (phosphonomethyl) glycine), sobre organismos no blancos y sobre el ambiente. Este herbicida, de amplio espectro de acción, inhibe la 5-enolpyruvyl shikimate 3-synthase, enzima clave en la síntesis de aminoácidos aromáticos. Esta enzima se encuentra presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Kishore y Shad, 1998). En consecuencia, bacterias y hongos podrían ser susceptibles a la acción del glifosato. Relyea (2005), evaluó el efecto del glifosato sobre la biodiversidad y productividad de especies acuáticas; trabajando con experimentos en mesocosmos, determinó una reducción del 22% en la riqueza de especies. En estos estudios, rangos de aplicación de glifosato de

uso corriente en la agricultura, resultaron altamente letales para renacuajos de algunas especies de anfibios, reduciendo la riqueza de éstas en un 70% y exterminando por completo dos especies. Estos cambios ocurrieron en períodos cortos de tiempo (dos semanas). Lo mencionado, reviste particular importancia, a la luz de la declinación global de anfibios, que en algunos casos, se correlaciona con proximidad a áreas agrícolas en que usan herbicidas (Bishop y col., 1999, Davidson y col., 2001). Los resultados de Relyea, respecto a anfibios, coinciden con evaluaciones locales realizados por Lajmanovich y col., (2003), quienes trabajando con renacuajos de *Scinax nasicus*, un anuro frecuente en territorios agrícolas y urbanos del litoral de Argentina, determinaron una alta mortalidad (de hasta el 100 %, según la dosis y el tiempo de exposición) en períodos breves de tiempo (24-96 horas). El herbicida produjo, además, malformaciones en los esqueletos de los renacuajos expuestos al producto. Las dosis utilizadas fueron las de uso corriente en agricultura. Daruich y col. (2001), analizando ratas preñadas, encontró que la exposición materna a este agroquímico, provocó anomalías funcionales en la actividad enzimática específica en el corazón hígado y cerebro, tanto en las madres, como en los fetos. Por su parte, Dallegrave y col., (2003), también en ratas, comprobaron alteraciones esqueléticas, y mortalidad de fetos, debidas al glifosato.

Otro de los agroquímicos muy utilizados en los agroecosistemas de Argentina, y en los cultivos de arroz, es el piretroide Cipermetrina (Olmos, 2006). Los piretroides se caracterizan por una actividad insecticida de amplio espectro basada en su neurotoxicidad (Salibián, 1992; Salibián y Marazzo, 1995). Se sabe que actúan interfiriendo la permeabilidad iónica de las membranas celulares, dificultando la generación y conducción de los impulsos del sistema nervioso central y periférico. Berlin y col. (1984) demostraron en insectos, calamares y anfibios que por exposición a piretroides, los tejidos nerviosos incrementan el influjo de sodio transmembrana e inhiben la ATPasa. En los mamíferos, se ha determinado que actúan sobre el mecanismo de entrada de los iones sodio, produciendo ralentización del cierre de los canales de sodio (Kaloyanova y col., 1991). La cipermetrina [alfa – ciano – 3 – fenoxibencil – 3 – (2, 2 diclorovinil) 2, 2– dimetilciclopropano carboxilato] es una mezcla racémica de ocho isómeros. Hay dos grupos de isómeros, los que tienen el anillo ciclopropilo del diclorovinilo y los grupos éster con orientación *cis* y los que poseen una orientación *trans*. En particular, cipermetrina es una mezcla de dos de los cuatro isómeros *cis* presentes en aproximadamente 25% de la cipermetrina, es decir los isómeros (1R, *cis*) S y (1S, *cis*) R. Cipermetrina- α contiene más del 90% del par enantiomérico más activo como insecticida (WHO, 1992). Se sabe que la cipermetrina es altamente tóxica para invertebrados acuáticos. Los valores de la concentración efectiva 50 (CE50) (inmovilización) a las 24 y 48 hs. para *Daphnia magna* son de 1,0 y 0,3 $\mu\text{g} / \text{L}$, respectivamente, y a las 24 hs. para *Gammarus pulex* es de 0,05 $\mu\text{g} / \text{L}$. Así, la cipermetrina es altamente tóxica para numerosos *taxa* de artrópodos acuáticos, pero posee una menor toxicidad en moluscos. Es altamente tóxica también para peces, con valores de concentración letal 50 (CL50) a las 96 horas pos-tratamiento entre 0,7 – 350 $\mu\text{g}/\text{L}$ dependiendo de la formulación. El peligro de la cipermetrina en peces e invertebrados acuáticos reside en su toxicidad aguda. En los

ensayos de laboratorio, su toxicidad para lombrices de tierra es baja, mientras que para abejas es altamente tóxica (WHO, 1992). Investigaciones en Argentina (Izaguirre y col., 2000; Casco y col., 2006) demostraron la inducción que produce la cipermetrina, en el desarrollo de procesos apoptóticos (muerte celular programada) de las células nerviosas de larvas de anfibios. Al mismo tiempo, Cabagna y col. (2006) probaron la genotoxicidad que produce este químico en especies de anuros regionales.

Como parte importante de un estudio integral sobre los efectos no deseados de los agroquímicos sobre la fauna silvestre hay que considerar otros biomarcadores. Así, la utilización de los parámetros hematológicos es una herramienta útil para proveer un sistema de alerta temprano de tóxicos de estrés, antes de que puedan ser detectadas respuestas a nivel de comunidad y ecosistema (Perí y col., 2004). En lo que respecta a su utilización se ha comprobado, al estudiar el efecto de herbicidas sobre los perfiles metabólicos, alteraciones significativas en los niveles de proteínas totales, albúmina, globulina y colesterol, acompañado de una disminución en la concentración de glucosa en suero (O'Hara y col., 1983). También, Fujitani y col., (2001) observaron un efecto significativo de algunos plaguicidas sobre los recuentos de glóbulos blancos y rojos, del hematocrito y de la hemoglobina. En este contexto, las investigaciones hematológicas cobran relevancia, ya que a través de estos estudios se puede inferir el estado sanitario e inmunológico de las poblaciones silvestres (Gilbertson y col., 2003). Asimismo, se utilizan biomarcadores de inestabilidad genómica que se expresan como uniones entre los núcleos de las células binucleadas, micronúcleos y otros parámetros que permiten detectar si las poblaciones están expuestas a plaguicidas genotóxicos (Ferrier y col., 1998; Vanderkerken y col., 1989; Zoll-Moreux y Ferrier, 1999).

Muchos productos químicos utilizados en la agricultura pueden contaminar los hábitat acuáticos y causar graves daños a los ecosistemas (Knutson y col., 2004). Una parte importante de los nitratos añadidos a los suelos como fertilizantes contaminan los horizontes edáficos (Bogardi y col., 1991), y por escorrentía a través de aguas de drenajes o por infiltración, también las aguas superficiales de ríos, embalses y charcas. En general, el incremento artificial de nitrógeno en la naturaleza es considerado actualmente como un nuevo cambio ambiental global de resultados imprevisibles (OECD, 1982). Pequeños aumentos de la cantidad de nitrógeno pueden ocasionar la eutrofización (incremento de materia orgánica, en forma de biomasa de algas, etc.) y el consiguiente descenso en la cantidad de oxígeno disponible para otros organismos acuáticos. Todo esto, provoca mortalidades importantes de peces, anfibios y otras especies de la fauna acuática (Blaustein y col., 1994). Paralelamente, también puede favorecer el desarrollo de algas tóxicas, microorganismos patógenos y particularmente en los anfibios, se lo ha relacionado con la mayor incidencia de parásitos y malformaciones (Johnson y Chase, 2004). El caso de los nitratos es uno de los más estudiados, su toxicidad directa es pequeña, pero en cambio, cuando se reduce a nitritos, son perjudiciales para los vertebrados acuáticos. Los nitritos pasan rápidamente a la sangre y se forma así metahemoglobina, que pierde su capacidad de transportar oxígeno y causa metahemoglobinemia. Los nitratos también

pueden dar lugar a nitrosaminas, sustancias potencialmente cancerígenas (Bogardi y col., 1991). Algunos estudios en anfibios han señalado que este fenómeno de eutrofización de cuerpos de agua, por lixiviado pluvial de campos agrícolas, representa una amenaza para la supervivencia, crecimiento, desarrollo y estado de salud de estos vertebrados, pudiendo incrementar inclusive su vulnerabilidad a parasitosis y a aberraciones nucleares (e.g. Baker y Waights 1994, Xu y Oldham, 1997; Marco y col., 1999; Peltzer y col., 2008).

La importancia de los bioensayos en el control de la contaminación se basa en la capacidad de éstos de valorar efectos sobre los organismos vivos, permitiendo establecer relaciones dosis-respuesta para un determinado compuesto químico. La posibilidad de estandarizar estos métodos hace que los resultados, obtenidos tras el cumplimiento de unos requerimientos específicos, sean comparables, repetibles y confiables. Los bioensayos permiten además medir directamente la biodisponibilidad y los efectos tóxicos aditivos, antagónicos y sinérgicos de los compuestos presentes en una mezcla compleja. En conclusión, son métodos comparativamente más rápidos y de menor coste que otros estudios químicos y biológicos (de Vlaming y col., 2000; Ronco y Díaz Báez, 2004).

En resumen, con la implementación del presente plan de monitoreo, se pretende llegar a una mejor comprensión del impacto de los arrozceras sobre el denominado “Macrosistema Iberá”. En este sentido, los estudios a realizar servirán de base para futuras propuestas de manejo y conservación de nuevas áreas protegidas. Al mismo tiempo, representarían un sistema de alerta temprana para prevenir deterioros en estos valiosos ecosistemas. En cuanto a los objetivos y el conocimiento que se generará permitirán: integrar información (datos ecológicos y biomarcadores) para predecir las tendencias de las poblaciones potencialmente afectadas, elaborar mapas de riesgo, contar con datos de riesgo ecotoxicológico (o de impacto para la vida silvestre) por el uso de plaguicidas y fertilizantes, obtener información detallada sobre la presencia/ausencia de residuos de productos órganoclorados (que pueda ser tenida en cuenta para la interpretación y/o prevención de mortandades masivas de fauna) y aportar antecedentes para advertir sobre posibles riesgos para la salud humana.

METODOLOGIA

El diseño del muestreo se adecuará a la fenología y cronograma de fumigación de los distintos cultivos a evaluar, y en todos los casos se tomaran muestras, en forma simultánea, en los sitios: “INCOGNITA” (denominados **ARR** “arrozales” y su área cercana de influencia) y se contrastarán con “SITIOS CONTROLES” (**SC**). Para la selección de los sitios a muestrear, se emplearán fotografías aéreas e imágenes Landsat actualizadas. Posteriormente se reconocerán, en el campo, los ambientes y se verificará la fotointerpretación. Todos los puntos de muestreo serán georreferenciados mediante el uso de sistemas de posicionamiento por satélite (GPS). Para la disponer de una visión integradora y holística de la información, obtenida en campo y laboratorio, se desarrollará un Sistema de

Información Geográfica (SIG), que permitirá localizar las áreas de riesgo. En la etapa inicial del proyecto se implementará la cartografía digital e imágenes de satélite del área de estudio, con las principales capas temáticas, a los fines de presentar las grandes unidades de paisaje. Posteriormente, en las áreas representativas y/o problemáticas, se elaborará cartografía de cobertura y ocupación del suelo (escala 1:250.000) a partir de técnicas de teledetección, para su integración posterior al SIG. Los estudios locales vinculados a reservas naturales y áreas protegidas requerirán de información cartográfica de mayor detalle (escala 1:50.000) y técnicas integradas de multifunción de datos de sensores remotos de variada resolución espacial, para lo cual se aplicarán algoritmos de transformación RGB/HSI a los efectos de integrar las bandas multiespectrales del ETM+ (30 m) con la banda pancromática del sensor ETM+ (15 m) o con la banda pancromática del sensor HRV del satélite Spot (10 m.), alcanzando una mayor resolución espacial con la riqueza espectral de las bandas multiespectrales.

Para el tratamiento digital de las imágenes, desarrollo y trabajo sobre mapas temáticos y SIG, se utilizarán como soporte informático los programas de análisis espacial que permiten integrar información raster y vectorial: ErMapper V6, Idrisi 32, Idrisi V2, Oziexplorer, Arc View Gis y Global Mapper Erdas.

1- COMPONENTE: Residuos de Contaminantes

Objetivo: Detectar y cuantificar residuos de agroquímicos utilizados en los cultivos de arroz, en tejidos de vertebrados silvestres de la Reserva Iberá y áreas de influencia.

Con el fin de detectar y cuantificar residuos de plaguicidas órganoclorados en tejidos grasos de distintos vertebrados (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos), se seguirá la metodología analítica descrita en Lajmanovich y col., (2002; 2005b) y Lorenzatti y col., (2004). De acuerdo al tipo de residuo a examinar, se procesarán de acuerdo a la técnica de la FED Safety and Inspection Service (IDF 1978), basada en una separación en columna de alúmina neutra y eluyendo con éter de petróleo. Las muestras serán analizadas por triplicado y sembradas con estándares certificados (Applid Science 99,2%). Se trabajará en el modo de inyección automático splitless con un volumen de inyección de 1µl. El equipo a utilizar será un cromatógrafo VARIAN 3400 con detector de captura electrónica y columna capilar DB-608 (30 m x 0.25 mm I.D., 1.5 µm).

Los datos obtenidos serán comparados con información previa y datos bibliográficos, con el fin de interpretar las tendencias en el hallazgo de residuos de plaguicidas, presencia de sitios controles o libres contaminación, posibles fenómenos de biomagnificación y otros aspectos que permitan dilucidar la posible dispersión de los compuestos órganoclorados en las matrices ambientales a estudiar.

2- COMPONENTE: Biomarcadores

Objetivos:

- a) *Estimar la posible exposición de las poblaciones de vertebrados silvestres de la Reserva Iberá y áreas de influencia, a plaguicidas anticolinesterásicos utilizados en los cultivos de arroz.*
- b) *Establecer si las poblaciones estudiadas están expuestas a plaguicidas genotóxicos.*

1. Colinesterasa plasmática: Con el propósito de estimar la posible exposición de las poblaciones de vertebrados silvestres a plaguicidas anticolinesterásicos, se trasladarán ejemplares vivos (anfibios y peces) al laboratorio y se tomarán muestras de sangre. En el caso de ser necesario, las muestras serán obtenidas *in situ* y trasladadas en contenedores de nitrógeno líquido. Se determinará el valor de la actividad de la butirilcolinesterasa (BChE), por el método de Ellman (1961). Esta es una técnica colorimétrica que está fundamentada en la liberación de la tiocolina a partir de un sustrato, la butiriltiocolina, y la transformación de ésta en un compuesto coloreado por agregado de ditiobisnitrobenzoato (DTNB). En medio alcalino origina compuestos resonantes amarillos que pueden determinarse colorimétricamente a 405 nm en un espectrofotómetro. La actividad de esta enzima, presente en el plasma sanguíneo, es la que da origen a la primera reacción de hidrólisis de la tiocolina. Acorde con Sparling y col. (2001), en las poblaciones silvestres es difícil contar con valores basales pre-exposición, y la contrastación de los valores obtenidos se realiza con animales provenientes de sitios en donde no se utilicen agroquímicos organofosforados o carbámicos. Para la comparación, entre los sitios, se realizarán análisis de ANOVA y test Tukey a posteriori; si las variables no se distribuyen normalmente se realizarán análisis no paramétricos. Asimismo, se considerará inhibición enzimática, cuando los valores desciendan 2 SD por debajo de la media del suero de referencia (Sánchez-Hernández, 2003; Lajmanovich y col., 2004).

2) Modelos experimentales de reactivación *in vitro* y pruebas a campo:

La reactivación de la BChE plasmática es una prueba bioquímica para diferenciar entre la colinesterasa inhibida por organofosforados y carbamatos. Se usa en la toxicología de animales silvestres para la investigación de incidentes por envenenamiento de plaguicidas y es complementaria al análisis químico de residuos de plaguicidas (Trudeau y Sans Cartier 2000).

Protocolo de Reactivación con pralidoxima (2-PAM) [adaptación de la técnica utilizada en lagartos (Sánchez-Hernández, 2001; 2003) proporcionada por el autor]. Se pondrá a punto en distintas

especies de anfibios especialmente en las más abundantes y representativas de los agroecosistemas (Peltzer y col., 2006) y en *Tupinambis merinae* (Reptilia, Teiidae).

Reactivos: 2-PAM (Paralidoxima), Maloxón (disuelto en Dimetilsulfóxido), Buffer Tris/CaCl₂, BTCl y DTNB. Muestra: plasma o suero. Método: se inhibirá la muestra con Maloxón (blanco con igual volumen de agua), se incubará a 25°C (20 minutos) y se medirá la actividad de la BChE para calcular los porcentajes de inhibición. Se agregará 2-PAM y se leerá la actividad de la BChE cada 15 minutos para determinar los porcentajes de reactivación.

En los estudios a campo, que complementan las evaluaciones enzimáticas, se seguirá la metodología aplicada por Sánchez-Hernández y col. (2004). Para esto, se comparará la actividad enzimática antes y después de la reactivación. Si la actividad es mayor, después de la reactivación química con 2-PAM que el valor original, se debe confirmar esta reactivación determinando la actividad de la BChE de la muestra incubada con agua. Si la enzima se reactiva en la presencia de 2-PAM y no se reactiva después de la incubación con agua, se interpretará como un caso de inhibición causada por un compuesto organofosforado. Si la reactivación ocurre en la ausencia de 2-PAM es más probable que el inhibidor sea un carbamato.

3. Test de micronúcleos: Con el objetivo de determinar si las poblaciones estudiadas están expuestas a plaguicidas genotóxicos, se cuantificará como biomarcador de efecto informativo la frecuencia de micronúcleos en glóbulos rojos de anfibios y peces (Al-Sabti y Metcalfe 1995; Lajmanovich y col. 2005a). Los micronúcleos están constituidos por una pequeña masa nuclear delimitada por membrana y separada del núcleo principal. Se forman durante la telofase de la mitosis, cuando se forman los núcleos de las células hijas y son los resultantes de fragmentos cromosómicos acéntricos o de cromosomas enteros que no fueron incluidos en los núcleos principales, por lo tanto representan pérdida cromatínica como consecuencia de un daño cromosómico estructural (fragmento) o daño en el apareamiento cromosómico (Zoll-Moreux y Ferrier, 1999). En el conteo se seleccionarán hematíes con núcleos intactos, de tamaño y condensación cromatínica semejantes, con membrana celular intacta y claramente distinguibles de las células adyacentes. Para considerar la presencia de micronúcleo, este debe presentar morfología y coloración idénticas al núcleo principal, diámetro 1/16-1/3 del mismo y no debe estar ligado o conectado al núcleo (Ferrier y col., 1998). Además, se tomarán en cuenta otros marcadores de daño citogenético como son la presencia de células apoptóticas, necróticas, con puentes nucleocitoplasmáticos (estas últimas como biomarcador de inestabilidad genómica que se expresan como uniones entre los núcleos de las células binucleadas) y otros parámetros que permitan detectar el efecto de plaguicidas clastogénicos como aneuploidogénicos (Vanderkerken y col., 1989). Los análisis estadísticos se realizarán siguiendo los criterios de Zoll-Moreux y Ferrier (1999), comparando las frecuencias de micronúcleos de poblaciones potencialmente expuestas a plaguicidas con frecuencias normales.

3- COMPONENTE: Eutrofización de Ambientes Acuáticos

Objetivo: Determinar posibles fenómenos de eutrofización en la Laguna Iberá y cuerpos de agua asociados.

Dentro de los indicadores de contaminación eutrófica, se pueden considerar a los siguientes parámetros: amonio, nitritos, nitratos y ortofosfatos (OECD, 1982). La producción de amonio es un ejemplo del proceso de reciclaje natural, puede ser encontrado en los excrementos de organismos acuáticos y es el resultado de la descomposición de la urea. En lo que respecta a los nitritos, las fuentes antropogénicas más comunes son las descargas de aguas residuales y las provenientes de escorrentía de campos tratados con fertilizantes. El nitrógeno en forma de nitritos es perjudicial para los vertebrados acuáticos. Los nitritos pasan rápidamente a la sangre y se fijan a la hemoglobina impidiendo la oxigenación de los tejidos. Los iones nitrito pueden formar compuestos nitrogenados carcinogénicos. Los procesos de descomposición son una posible fuente de nitratos. Los residuos urbanos, así como los restos de animales y plantas en descomposición producen amonio, que, en parte es absorbido por las plantas acuáticas, pero mayoritariamente es transformado en nitrato y nitrito por las bacterias, incrementando los niveles de nitrato. Las fuentes antrópicas de fósforo incluyen fertilizantes y detergentes provenientes de los residuos agrícolas.

En relación a la calidad del agua, también se evaluarán el oxígeno disuelto, DBO, transparencia, pH y conductividad. En todos los casos, los valores obtenidos se contrastarán con los recomendados por las Guías Nacionales de Calidad de Agua (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación) y por la CCME (1999).

Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos

Estas mediciones preliminares "in situ" se realizarán con kits comerciales y medidores de campo, que tienen la ventaja de ser rápidos, sencillos y se adaptan a trabajos en campo. Los parámetros fisicoquímicos que se seleccionan serán: temperatura (C°), conductividad (uS/cm), pH, indicadores químicos de procesos de degradación de materia orgánica, oxígeno disuelto y turbidez.

- *Temperatura agua:* (Digital Stem Thermometer y termómetro/higrómetro digital, modelo 3078)

La actividad fisiológica y velocidad de las reacciones químicas está regida por la temperatura. La elevación de la misma dentro de ciertos límites acelera los mecanismos de respiración, nutrición, reproducción; mientras que la disminución provoca efectos opuestos. También tiene relación con la

saturación de oxígeno en el agua. Además, con un termómetro/higrómetro se registraron la temperatura y humedad ambiental.

- *Conductividad*: (Hanna Instruments, UPW HI 98 309)

La conductividad da un indicio de los sólidos disueltos; este parámetro mide la capacidad del agua para transportar la corriente eléctrica. Los conductímetros portátiles cuentan con sensores de temperatura integrados, para poder realizar una compensación de temperatura óptima. El coeficiente de temperatura se encuentra ajustado fijo (2%). El rango de medición es de 0 a 1999 $\mu\text{S}/\text{cm}$ con una resolución de 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

- *pH*: (Hanna Instruments, checker Pocket-pHmeter, modelo: pH-1 WP HI98151)

El pH es una medida de la acidez del agua. Su valor oscila entre 0-14, considerando 7 como pH neutro. La capacidad de regular el equilibrio dióxido de carbono-bicarbonato-carbonato, orienta a la calidad de agua. Un cambio en 1 unidad de pH, por ejemplo de 5 a 4 nos dice que la segunda muestra es 10 veces más ácida que la primera debido a que la escala que se utiliza para medir pH es logarítmica.

Indicadores químicos de procesos de degradación de materia orgánica: (determinación de carga orgánica del sistema)

- *Nitratos* (Test nitrates, 1.10020.0001, Merck ®): Son el producto final de la oxidación del nitrógeno, que proviene en su mayoría de desechos cloacales, ganadería y agricultura.
- *Nitritos* (Test nitrites, 1.10007.0001, Merck® y nitrite test 0.0025-0.5 mg/l, Merck ®). Los nitritos en agua provienen generalmente de los fertilizantes, excretas animales, desechos urbanos, industriales y aditivos alimentarios. En concentraciones elevadas reaccionan formando nitrosaminas de alto poder cancerígeno y tóxico. Generalmente, la concentración de nitritos en agua superficial es muy baja, pero pueden aparecer concentraciones inesperadamente altas, debido a la contaminación industrial o de aguas domésticas residuales.
- *Amonio* (Test Ammonium, 0.2 - 3.9 mg/l $\text{NH}_4\text{-N}$, 1.11117.0001, Merck®). Las plantas utilizan amonio como nutriente. Las bacterias pueden convertirlo a partir de nitrito y nitrato. El amonio es altamente tóxico para la vida acuática.
- *Fósforo* (Phosphat test, 10-500 mg/l, 1.10428.00001, Merck®). El exceso de fósforo provoca eutrofización e incluye distintos compuestos como ortofosfatos, polifosfatos y fósforo orgánico. La presencia nos da indicio de detergentes y fertilizantes. Actualmente la determinación se

hace transformando todas las especies en ortofosfatos que son los que se determinan por análisis químico. En solución sulfúrica los iones ortofosfato (PO_4^{-3}) forman con los iones molibdato ácido molibdofosfórico. Este último se reduce a azul de fosfomolibdeno ("PMB") y la concentración de fosfatos se determina semicuantitativamente por comparación visual del color de la solución de medición con las zonas de color de una probeta.

- *Oxígeno disuelto*: (Oxygen test, 1-12 mg/l O_2 , 1.14662.0001, Merck®)

La presencia de oxígeno permite el desarrollo de una vida normal en aguas naturales. La molécula de oxígeno presente en el agua no está disponible para ser utilizada por los organismos acuáticos. Solo una pequeña porción de estas moléculas se encuentran disueltas (10^6 moléculas/10⁶ partes de agua); siendo este oxígeno primordial para la vida de peces y plancton. El mismo también puede ser consumido por las bacterias presentes en el medio. Cabe considerar que la presencia de materia orgánica, proveniente de aguas residuales, facilita el consumo del O_2 por estos microorganismos, dejando poca cantidad disponible para la vida acuática.

- *Turbidez* (disco de Secchi)

La turbidez es una medida del grado en el cual el agua pierde su transparencia debido a la presencia de partículas en suspensión. Cuantos más sólidos en suspensión haya en el agua, más sucia parecerá ésta y más alta será la turbidez. Es considerada una buena medida de la calidad del agua. Un aumento de la misma afecta la subsistencia de algunas especies acuáticas, relacionándolo con la disminución del acceso de luz natural que limita el desarrollo de las plantas acuáticas y algas que sirven de sustento a los peces.

- *Recuento coliformes totales* (Envirocheck® contact E)

Las coliformes son bacterias aerobias facultativas, gram negativas, que dan indicio de contaminación fecal (entérica), ya que son flora normal del tracto digestivo y su concentración se encuentra incrementada en las últimas porciones del mencionado aparato del hombre. Dentro de este grupo encontramos: *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. y *Citrobacter* sp.

Además, en el caso de ser necesario, se establecerá un **Plan De Monitoreo Analítico** acorde al siguiente esquema:

Indicadores	Metodología Analítica Recomendada	Frecuencia de monitoreo(1)
p H	APHA-AWWA-WPCF (parte 4500 H)	Mensual/Trimestral
Demanda Bioq. del oxígeno(DBO5)	APHA-AWWA-WPCF (parte 5210 B)	Mensual
Sólidos suspendidos	APHA-AWWA-WPCF (parte 2540 D)	Mensual
Oxígeno disuelto	APHA-AWWA-WPCF (parte 4500 O G)	Mensual
Coliformes totales	APHA-AWWA-WPCF (parte 9222 B)	Mensual
Fósforo total	Colorimétrico – Vanadomolybdophosphorico ácido APHA-AWWA-WPCF (parte 4500-P C)	Mensual
Nitrógeno total	NO3+N02+NH3+N	Mensual
Nitritos	APHA-AWWA-WPCF (parte 4500 NO2 B)	Mensual
Amoniaco	APHA-AWWA-WPCF (parte 4500 NH3 B/F)	Mensual
Nitrógeno Kjeldahl	APHA-AWWA-WPCF (parte 4500 Norg B)	Mensual
Coliformes totales y fecales, (NMP/100ml)	(APHA). (1989)	Mensual

4- COMPONENTE: Biensayos, Valoración Ecotoxicológica

Objetivo: Incorporar ensayos ecotoxicológicos estandarizados para la caracterización de los potenciales efectos de las arroceras sobre las comunidades acuáticas del Iberá.

Según Burger (1997) la vulnerabilidad de los ecosistemas a la exposición por compuestos químicos depende de tres factores: a) diferencias en el destino y transporte del compuesto b) diferencias en la complejidad del sistema y c) diferencias en las respuestas individuales de los organismos. Esta vulnerabilidad, debe estar reflejada en los parámetros biológicos en una Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) (U.S. EPA, 1998).

1. Bioensayos con muestras de agua procedentes de arrozales y áreas de mezcla (o desagüe) en áreas de la Reserva Iberá.

Ensayo de Reproducción (*Daphnia magna*)

Las muestras de agua se obtendrán en distintas situaciones de utilización de agroquímicos (fertilizantes, herbicidas e insecticidas) (pre-aplicación, inmediatamente luego de la aplicación y post

aplicación). Las muestras se filtraran a través de una malla de 60 µm de luz. Para los controles de laboratorio se utilizaran 100 ml de agua reconstituida (UE, 1984). En el caso de las muestras de agua procedentes de arrozales los ensayos se llevaron a cabo con 100 ml de agua filtrada, lo que permitiría la valoración de la toxicidad de las muestras de agua del arrozal sin diluir. A los 100 ml de cada muestra y control de laboratorio se les añadirá un juvenil de *Daphnia magna* menor de 24h. Los bioensayos se llevaran a cabo en una cámara climatizada a una temperatura de 20 ± 2 °C, la luz se ajustará a una intensidad de 1000 lux, con un ciclo de luz: oscuridad de 12 h: 12h. La duración del ensayo será de 21 días (OECD, 1993a). Al principio de la primera semana las pérdidas por evaporación de muestra de agua de arrozal se compensaran rellenando con la correspondiente muestra filtrada, a los 15 días las muestras serán renovadas completamente. Cada 48h los organismos se alimentaran con *Chlorella vulgaris* a una proporción de 0,25 mgC/daphnia adulta, reduciéndose a la mitad esta cantidad para organismos menores de 7 días. Todos los lunes, miércoles y viernes durante el período de bioensayo se contarán los juveniles de daphnia en muestras y controles de laboratorio.

Ensayo de Inhibición del Crecimiento (*Chlorella vulgaris*)

Las muestras para realizar los ensayos con *Daphnia magna*, serán filtradas a su vez por filtros estériles de 0,22 µm (Millipore) para realizar el ensayo con *Chlorella vulgaris*, ya que este bioensayo se realiza en condiciones de esterilidad. Con el fin de establecer la cantidad máxima de muestra a ensayar se utilizaron como controles de laboratorio varias diluciones de dos medios denominados BBMc y BBMe, lo que supone un total de nueve combinaciones diferentes de sales y nutrientes. El cultivo del alga en suspensión acuosa se realiza en BBMc (Bold Basal Medium- Bischoff y Bold, 1963), mientras que en el caso del BBMe el contenido de nutrientes es el recomendado para ensayo por la OECD (1993b). El volumen total de ensayo será de 30 ml. En el caso de las muestras del arrozal, y para mantener la cantidad de nutrientes recomendados por la OECD, a 27 ml de muestra filtrada se le añadieran 3 ml de BBMe 10X, pudiéndose de esta manera ensayar las muestras de agua de arrozal a un 90% (dilución 9:1). A cada muestra y control se le añadirá un inóculo de un cultivo en agar de *Chlorella vulgaris* tras activación por exposición a 8000 lux durante 24h. Los bioensayos se llevaran a cabo en cámaras climatizadas a una temperatura de 20 ± 2 °C y la luz se ajustará a una intensidad de 8000 lux. La duración del período de bioensayo será de 72h. Los recipientes que contengan las muestras y controles de laboratorio se agitaran dos veces al día con el fin de impedir que las células sedimentaran. Cada 24h se medirá la absorbancia a 440 nm mediante un espectrofotómetro. Los datos de absorbancia obtenidos a los tiempos 0, 24, 48 y 72 h se representaran para obtener una curva de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en cada muestra y control.

2. Bioensayos con muestras de sedimentos procedentes de arrozales y áreas de mezcla (o desagüe) en áreas de la Reserva Iberá.

Las muestras de sedimentos (arrozales y controles) (2-3 cm de profundidad) serán recolectadas en frascos de vidrio de aprox. 200 ml. El extracto de sedimentos se obtendrá por centrifugación a 10000 rpm durante 20 minutos previa adición de 25 ml de solvente utilizándose una dilución al 1% para el test de semillas y al 10% para el test de nemátodos (Dutka et al. 1988).

Ensayos con *Lactuca sativa* (variedad great lakes 366)

Se colocaran 20 semillas en capsulas de Petri acondicionadas sobre papel de filtro (Whatman n°3) a las que se le agregaron 5,5 ml de la muestra, o igual cantidad de agua destilada. Además, se realizaran controles positivos para toxicidad con cloruro de cadmio en distintas concentraciones (10, 100 y 200 ppm), con metanol y con dimetilsulfóxido. Las cápsulas se incubaran a 22°C en oscuridad durante 96 horas y se contará el numero de semillas germinadas y se medirá la longitud de las raíces. Se consideran no tóxicas a las muestras en las que germinen más del 90% respecto del control con agua destilada, tóxicas a las que presenten valores entre 75% y 90% y muy tóxicas a menos del 75% de germinación respecto del control. La inhibición de elongación de la raíz (*EI*) se calculará dividiendo la elongación promedio (n=20) en la muestra menos la elongación promedio en el control sobre la elongación promedio del control con agua destilada. $EI = 0$ indica que la muestra no presenta toxicidad aguda. Si *EI* da un valor negativo hay inhibición de la elongación de la raíz y la muestra es considerada tóxica. Valores positivos de *EI* superiores a 0 indican estimulación de la elongación de la raíz (OECD, 1993b).

Ensayo de *P. anagrellus redivivus* (nematodo)

El bioensayo con nemátodos es muy sensible para evaluar efectos subetales. Para la prueba se tomarán 100 animales J2; en grupos de 10 que se expondrán a diferentes diluciones de la muestra; durante 96 h se controlaran las siguientes reacciones: a) Crecimiento en tamaño, b) pérdida del crecimiento, c) maduración y d) muerte. El crecimiento de J2 a J3, o de J3 a J4, requiere mínima actividad genética, mientras que el paso de J4 a adulto requiere gran actividad genética. Los mutágenos inhiben la maduración de los animales J4 al estado adulto, inhibición que se usa como indicador de potencial actividad mutagénica de la muestra. El ensayo aplicado en este estudio mide tres actividades 1) la capacidad de sobrevivida en la muestra durante 96 h. a 21+ 1°C, 2) la capacidad de los animales J2 de alcanzar el estado J4 y 3) la capacidad de los animales J4 de alcanzar el estado adulto. Los resultados se comparan con controles negativos y positivos (Samailoff, 1990).

Referencias

A

- Abdullah, A.R.; Bajet, C.M.; Martin, M.A.; Nhan, D.D. & Sulaiman, A.H. 1997.** Ecotoxicology of Pesticides in the Tropical Paddy Field Ecosystem. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 59-70.
- Adams, S.; Shepard, K.; Greeley, M.; Jiménez, B.; Ryon, M.; Shugart, L. & McCarty, J. 1989.** The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Env. Res.* 28: 459-464.
- Alberto, L. & Peña, J. 1981.** Niveles de contaminantes organoclorados y metales pesados en huevos de aves de las Marismas del Guadalquivir, 1975. *Doñana Acta Vetebrata* 8: 206-206.
- Allsopp, M. & Erry, B. 2000.** *COPs en América Latina. Una revisión de los niveles de los contaminantes orgánicos persistentes en América Latina.* Universidad de Exeter, Exeter, Reino Unido.
- Al-Sabti K & C Metcalfe 1995** Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* Jun;343(2-3):121-35.
- Alvarez, B.B. 2003.** *Fauna del Iberá.* Ed. EUDENE. Corrientes, Argentina.
- APHA., 1989.** *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* American Water Works Association & Water Pollution Control Federation. 17 th ed., WashintonWashington, D.C.USA.
- Arbo, M.M. & Tressens, S.G. 2002.** *Flora del Iberá,* EUDENE, Corrientes, Argentina
- Arnold, S.; Vonier, P. Collins, B.; Klotz, D.; Guillette, L. & Mclachlan, J. 1997.** In vitro synergistic interaction of alligator and human estrogen receptors with combinations of environmental chemicals. *Environ. Health Perspect.*, 105: 615-618
- ASIH, HL & SSAR. 2001.** *Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field research.* <http://www.utexas.edu/depts/asih/herpcoll.html>. Acceso el 13/06/02.
- Attademo, A.M.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2004.** Nuevo caso de malformación en un ejemplar de rana (*Leptodactylus ocellatus*) (Amphibia: Anura) del litoral argentino. *Bol. Rev. Esp. Herp.*, 15: 20-22.
- Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.; Cabagna M. & Fiorenza, G. 2007.** Plasma. B-esterases and Glutathione S-transferase activities in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology* 16(8):533-9.

B

- Badii Zabeh, M H.; Garza Cueva, R.; Garza Almanza, V. & Landeros Flores, J. 2005.** *Los Indicadores Biológicos en la Evaluación de la Contaminación por Agroquímicos en Ecosistemas Acuáticos y Asociados.* CULCyT.
- Baker, J. & Waight, V. 1994.** The effects of nitrate on tadpoles of the tree frog (*Litoria caerulea*). *Herpetol. J.*, 4:106-108.
- Bambaradeniya, C.N.B.; Edirisinghe, J.P.; De Silva, D.N.; Gunatilleke, C.V.S.; Ranawana, K.B. & Wijekoon, S. 2004.** Biodiversity associated with an irrigated rice agroecosystem in Sri Lanka. *Biodiv. Conserv.*, 13:1715–1753.
- Bambaradeniya, C.N.B.; Fonseca, K.T. & Ambagahawatte, C.L. 1998.** A preliminary study of fauna and flora of a rice field in Kandy, Sri Lanka. *Ceylon J. Scien.*, 25: 1–22
- Bar, M.E.; Oscherov, E.B. Damborsky, M.P.; Avalos, G. & Rubio, G. 2004.** *Comunidades de Arthropoda en la Cuenca de Iberá, Corrientes.* Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Resumen: B-053.
- Berlin, J.R.; Akera, T.; Brody, T.M. & Matsumura, F. 1984.** The ionotropic effects of a synthetic pyrethroid decamethrin on isolated guinea pig atrial muscle. *European J. Pharmacol.*, 98: 313-322.
- Bhuiyan, S.I. & Castañeda, A.R. 1995.** The impact of ricefield pesticides on the quality of freshwater sources. In: *Impact of Pesticides on Farmer Health and the Rice Environment* (Eds.: Pingali, P.L. & Roger, P.A.). Kluwer, Norwell, MA, USA. pp 181-202.
- Bischoff, H.W. & Bold, H.C. 1963.** *Phycological studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species.* University of Texas. Publication number 6318.USA.
- Bishop, C.A.; Mahony, N.A.; Struger, J.P.N.G & Pettit, K.E. 1999.** Anuran development density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River watershed, Ontario, Canadá (1990-1992). *Env. Monit. Assessm.* 57: 21-43.

Blaustein, A.R.; Wake, D.B. & Sousa, W.P. 1994. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conser. Biol.*, 8: 60-71.

Bogardi, L.; Kuzelka, R.D. & Ennenga, W.G. 1991. *Nitrate contamination: exposure, consequence and control*. NATO ASI series G/ Ecological Sciences, Vol. 30. Springer-Verlag. Nueva York.

Bucheli, T. & Fent, K. 1995. Induction of cytochrome P-450 as a biomarker for environmental contamination. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 25: 201-268.

Burger, J. 1997. Methods for and approaches to evaluating susceptibility of ecological systems to hazardous chemicals. *Environ. Health. Perspect.* 105: 843-848.

C

Cabagna, M.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Attademo, M. & Ale, E. 2006. Induction of Micronucleus in Tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the Pyrethroid Insecticide Cypermethrin. *Toxicol. Environ. Chem.*, 88: 729-737.

Canevari, P.; Blanco, D.E.; Bucher, E.H.; Castro, G. & Davidson, I. 1999. *Los humedales de la Argentina: Clasificación, Situación Actual, Conservación y Legislación*. Wetlands International Publ. 46 (2ª edición), Buenos Aires, Argentina.

Canziani, G.; Rossi, C.; Loiselle, S. & Ferrari, R. 2003. *Los Esteros del Iberá. Informe del Proyecto "El Manejo Sustentable de Humedales en el Mercosur"*. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, Argentina.

Capó, M. 2002. *Principios de Ecotoxicología*. McGraw Hill. Madrid, España.

Carlsen, E.; Giwercman, A.; Keiding, N. & Skakkebaek, N.E. 1995. Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? *Environ. Health Perspect.*, 103: 137-139.

CASAFE. 2003. *Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina*. Tucumán, Argentina

Casco, V.; Izaguirre, M.F.; Marin, L.; Vergara, N.; Lajmanovich, R.; Peltzer, P. & Peralta Soler, A. 2006. Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin *Cell. Biol.Toxicol.*, 22: 199-211.

CCME., 1999. *Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life, Canadian Environmental Quality Guidelines*. Canada.

Chandrasena, J.P.N.R. 1988. Floristic composition and abundance of rice-field weeds in four low-country wet zone districts of Sri Lanka. *Tropical Pest Management* 34: 278–287.

Chiappe, M.B. & Piñeiro, D.E. 2002. *La agricultura uruguaya en el marco de la integración regional y su impacto sobre la sustentabilidad*. Uruguay.

Coupe, R.H., Thurman, E.M. & Zimmerman, L.R. 1998. Relation of Usage to the Occurrence of Cotton and Rice Herbicides in Three Streams of the Mississippi Delta. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 3673-3680.

Crain, D.A. & Guillette, J. 1997. Endocrine-disrupting contaminants and reproduction in vertebrate wildlife. *Rev Toxicol* 1:47-70.

Culley, D.D. & Applegate, H.G. 1967. Insecticide concentrations in wildlife at Presidio, Texas. *Pestic. Monit. J.*, 1(2):21-8.

D

Dallegre, E.; Di Giorgio Mantese, F.; Soares Coelho, R.; Drawans Pereira, J.; Dalsenter, P.R & Langeloh, A. 2003. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup^R in Wistar rats. *Toxicol. Letters* 142: 45-52.

Daruich, J.; Zirulnik, F. & Gimenez, M.S. 2001. Effect of the Herbicide Glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ. Resear.*, 85: 226-231.

Davidson, C.; Shaffer, H.B. & Jennings, M.R. 2001. Declines of the California red-legged frog: Climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses. *Ecol. Applic.*, 11: 464-479.

de Acevedo, F. & da Mata, A. 2003. *As bases toxicológicas da Ecotoxicologia*. RiMa. São Paulo, Brasil.

Depledge, M.; Aagaard, A. & Gyorkos, P. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.*, 21: 19-27.

de Llamas, M.C.; de Castro, A.C. & Pechen de D'Angelo, A.M. 1985. Cholinesterase activities in developing amphibian embryos following exposure to the insecticides dieldrin and malathion. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 14:161-6.

de Vlaming, V.; Connor, V.; DiGiorgio, C.; Bailey, H.C.; Deanovic, L.A. & Hinton, D.E. 2000. Application of whole effluent toxicity test procedures to ambient water quality assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 42-62.

Dickson K.L.; Maki A.W. & Brungs, W.A. 1987. *Fate and effects of sediment-bound chemicals in aquatic systems*. New York: Pergamon Pr.USA.

Diez Repetto, P. 2007. Monitoreo de indicadores de impacto ambiental vinculados al cultivo de arroz. <http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar/home1.htm>

Duré, M.I.; Kehr, A.I.; Schaefer, E.F. & Marangoni, F. 2008. Diversity of amphibians in rice fields from northeastern Argentina. *Interciencia*, 33: 523- 527.

Dutka, B.J. 1988. *Methods for microbiological and toxicological analysis of water, wastewater and sediment*. Dep. of Environment River Research Branch. National Water Res. Institute, Burlington, Ontario. Canadá

E

Ellman, G.L.; Courtney, D. & Andres, V. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95.

F

Fagotti, A.; Morosi, L.; Di Rosa, I.; Clarioni, R.; Simoncelli, F.; Pascolini, R.; Pellegrino, R.; Guex, G.D. & Hotz, H. 2005. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in frogs of the *Rana esculenta* complex in central Italy. *Amphib. Rept.* 26:93-104.

FAO 2005 .Water reports-10. California Regional Water Quality Control. Board, Sacramento, California, USA.

Ferrier, V.; Gauthier, L.; Zoll-Moreux, C.L. & Haridon, J. 1998. Genotoxicity tests in amphibians: a review. *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques and Practice*. CRC Press LLC. pp 507-519

Fulton, M.H. & Key, P.B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 37-45.

Fujitani, T.; Tada, Y., Noguchi, A.T. & Yoneyama, M. 2001. Effects of chlorpropham (CIPC) on the hemopoietic system of rats. *Food Chem. Toxicol.*, 39: 253-259.

G

Gilbertson, M.K.; Haffner, G., Rouillard, G.D., Albert, A., y Dixon, B. 2003. Immuno-suppression in the Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) Induced by Pesticide Exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 101-110.

Giraudó, A.R. 2003. Aves de los esteros del Iberá: síntesis del proyecto. p. 183-194. En: Alvarez, B.B. (Ed.). Fauna del Iberá - Avifauna. Corrientes, Eudene. 1ª. ed. 384 p.

Gutiérrez-Tórrez, W.A. 2004. *Presencia de residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en aguas residuales provenientes de la arrocería*. Las Cabañas que se depositan en la rivera norte de la laguna de Tisma, Masaya-Nicaragua.

H

Hall, R.J. & Henry P.F.P. 1992. Assessing effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs. *Herpetol. J.* 2(3): 65-71.

Hill, E.F. 2003. Wildlife toxicology of organophosphorus and carbamate pesticide. In: Handbook of Ecotoxicology (Eds: Hoffman, D.J.; Rattner, B.A.; Burton, G.A. & Cairns, J.J.), 2nd edition. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp.281-312.

I

IDF, 1978. *International Alumina column for the determination of chlorinated hydrocarbons in fatty foods*. Provisional International Dairy Federation. Standard 75ª. Food Safety and Inspection Service (USDA).

Iko, W.M.; Archuleta, A.S. & Knopf, F.L. 2003. Plasma cholinesterase of mountain plovers (*Charadrius montanus*) wintering in central California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 119-125.

INIA Treinta y Tres. 1996. Residualidad de plaguicidas: Convenio INIA-LATU. En Publicación especial del INIA No. 103. Treinta y Tres INIA.

Instituto Correntino del Agua y del Ambiente (ICAA-ACPA). 2007. Monitoreo de indicadores de impacto ambiental vinculados al cultivo de arroz. Corrientes, Argentina.

Izaguirre, M.F.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Peralta Soler, A. & Casco, V.H. 2000. Cypermethrin-Induced Apoptosis in the Telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* Tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 65: 501-507.

Iwakuma, T.; Shiraishi, H.; Nohara, S. & Takamura, K. 1993. Runoff properties and change in concentrations of agricultural pesticides in a river system during a rice cultivation period. *Chemosphere*, 27: 677-691.

J

Johnson, P.T.J.; Lunde, K.B.; Ritchie, E.G. & Launer, A.E. 1999. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science*, 284: 802-804.

Johnson, P.T. & Chase, J.M. 2004 Parasites in the food web: linking amphibian malformations and aquatic eutrophication *Ecol. Lett.*, 7: 521-526.

K

Kaloyanova, F.; Batawi, E. & Mostafa, A. 1991. *Human toxicology of pesticides*. CRC, Press, Inc. Boca Ratón

Kishore, G.M. & Shad, D.M 1998. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. rev. Biochem.*, 57: 627-663.

Knutson, M.; Richardson, W.; Reineke, D.M.; Gray, B.R.; Parmelee, J.R. & Weick, S.E. 2004. Agricultural ponds support amphibian population. *Ecol. Aplic.*, 14: 669-684.

Korth, W.; Thomas, M.; Foster, S.; McCorkelle, G. & Bowmer, K.H. 1995. Toxicity of rice and maize pesticides to *Ceriodaphnia* sp.: Implications for management of irrigation drainage water in Australia. *Australian J. Ecotox.*, 1: 55-62.

Kuhr, R.J.; Davis, A.C. & Bourke, J.B. 1974. DDT residues in soil, water and fauna from New York apple orchards. *Pestic. Monit. J.*, 7: 200-204.

L

Lajmanovich, R.; Lorenzatti, E.; de la Sierra, P.; Marino, F. & Peltzer, P. 2002. First Registrations of Organochlorines Pesticides Residues in Amphibians of the Mesopotamic Region, Argentina. *Froglog* 54: 4.

Lajmanovich, R.; Lorenzatti, E.; Maitre, M.I.; Enrique, S. & Peltzer, P. 2003. Comparative acute toxicity of the commercial herbicides glyphosate to neotropical tadpoles *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae). *Fres. Environ. Bull.*, 12: 364-367.

Lajmanovich, R.C.; Sánchez-Hernández, J.C.; Stringhini, G. & Peltzer, P.M. 2004. Levels of Serum Cholinesterase Activity in the Rococo Toad (*Bufo paracnemis*) in Agrosystems of Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72: 586-591.

Lajmanovich, R.C.; Cabagna, M.; Peltzer, P.M.; Stringhini, G.A. & Attademo A.M. 2005a Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mut. Resear.*, 587: 67-72.

Lajmanovich, R.; De La Sierra, P.; Marino, F.; Peltzer, P.; Lenardón, A. & Lorenzatti, E. 2005b. Determinación de residuos de organoclorados en vertebrados silvestres del litoral fluvial de Argentina. En: *Temas de la Biodiversidad del Litoral Fluvial Argentino II*. INSUGEO, Miscelánea, 14. Tucumán. pp 255-262.

Lenardón, A. & Enrique, S. 1998. Insecticidas organoclorados en el río Paraná. *Nat. Neotrop.*, 29: 111-116.

Lenardón, A.; Maitre, M.I.; Lorenzatti, E. & Enrique, S. 2000. Plaguicidas organoclorados en Leche Materna en Santa Fe, Argentina. *Acta Toxicol. Arg.* 8 (1): 2-4.

Livingstone, D. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 57: 195-211.

Lorenzatti, E.; Altahus, R.; Lajmanovich, R. & Peltzer, P. 2004. Residues of Endosulfan in Soy Plants in Argentina Croplands. *Fres. Environ. Bull.*, 13: 89-92.

N

Neiff, J.J. 2004. El Iberá..... en peligro? Ed. Fundación Vida Silvestre, Argentina

Neiff, J.J. & Poi de Neiff, A.S.G. 2006. Situación ambiental en la ecorregión Iberá In: La Situación Ambiental Argentina. Ed. Buenos Aires: Fundación Vida Silvestre, Argentina.

M

Marco, A.; Quilchano, C. & Blaustein, A.R. 1999. Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the Pacific Northwest, USA. *Environ Toxicol Chem* 18:2836-2839.

Melacon, M. 1995. *Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. Handbook of Ecotoxicology.* Lewis. Boca Raton, FL, EEUU.

O

OECD., 1982. *Eutrophication of waters. Monitoring, assessment y control.* Organization for Economical Cooperation and Development Final. Report. Environmental Directorate. Paris France.

OECD., 1993a. *Daphnia sp.* acute immobilisation test and reproduction test. Guideline for testing of chemicals, N° 202. Volume 1. Paris France.

OECD., 1993b. *Guidelines for testing of chemicals.* Final Report. Environmental Directorate Organization for Economical Cooperation and Development Final. Paris. France

Odum, E.P. 1972. *Ecología.* Interamericana. México.

O'Hara, G.P., Chan, P.K.; Harris, J.C.; Burke, S.S.; Smith, J.M. & Hayes, A.W. 1983. The effect of nitrofen [4-(2,4-dichlorophenoxy)nitrobenzene] on the reproductive performance of male rats. *Toxicology*, 28: 323-333.

Olmos, S. 2006. *Prácticas para el manejo de arroz.* Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Argentina

OMS., 1982. *DDT y sus derivados.* Criterios de Salud Ambiental. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.

Ouellet, M.; Bonin, J.; Rodríguez, J.; DesGranges, J.L. & Lair, S. 1997. Hind limb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free living anurans from agricultural habitats. *J. Wildl. Dis.* 33: 95-104.

P

Parera, A. & Moreno, D. 2000. *El venado de las pampas en Corrientes, diagnóstico de su estado de conservación y propuestas de manejo: situación crítica.* Fundación Vida Silvestre Argentina.

Parera, A. 2004. *Fauna de Iberá: composición, estado de conservación y propuestas de manejo.* Fundación Biodiversidad Argentina.

Park, D.; Hempleman, S. & Propper, C. 2001. Endosulfan Exposure Disrupts Pheromonal Systems in the Red-Spotted Newt: A Mechanism for Subtle Effects of Environmental Chemicals. *Environ. Health Perspect.*, 109: 669-673.

Peltzer, P.M.; Ponzza, M.L. & Lajmanovich, R.C. 2001. Caso de malformación en *Leptodactylus mystacinus* (Anura: Leptodactylidae). *Nat. Neotrop.*, 32: 173-176

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. *Herpetol. J.* 13: 95-98.

Peltzer, P.M.; 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, M. A. y Beltzer, A. H. 2006. Anuran diversity across agricultural pond in Argentina. *Biodiver. Conser*, 15: 3499-3513.

Peltzer, M.; Lajmanovich, R.C.; Sánchez-Hernández, J.C.; Cabagna, M.C., Attademo, A.M. & Basso, A. 2008. Assessment of agricultural pond eutrophication on survival and health status of the *Scinax nasicus* tadpoles. *Environ. Ecotoxicol. Saf.*, 70: 185-197

Peña Llopis, S. 2003. Estudio y modulación del metabolismo del glutatión en la tolerancia al estrés oxidativo generado por plaguicidas en organismos acuáticos de interés comercial. <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0324104-175802/>

Pereira, W.E. & Hostettler, F.D. 1993. Non point source contamination of the Mississippi river and its tributaries by herbicides. *Environ. Sci. Technol.*, 27:1542-1552.

Peri, S.I.; Fink, & Salibián, A. 1998. Hematological Parameters in *Bufo arenarum* Injected With Sublethal Dose of Lead Acetate. *Biom. Environ. Scien.*, 11: 70-74.

Punzo, F.; Laveglia, J.; Lohr, D. & Dahm, P. 1979. Organochlorine insecticide residues in amphibians and reptiles from Iowa and lizards from the southwestern United States. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 842-848.

R

Racke, K D. 1992. Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices. In: *Organophosphates: Chemistry, Fate, and Effects*. (Eds: Chambers, J.E. & Levi, E.P. Academic, New York, NY. pp 47-77.

RAMSAR, 2002. *Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar*. Dwight Peck, Ramsar.

Relyea, RA. 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.*, 15:618-627.

Ronald, J.; Kendall, J.; Funsch, M. & Bens, M. 1990. *Use of wildlife for on-site evaluation of bioavailability and ecotoxicity of toxic substances found in hazardous waste sites*. In: *In situ Evaluations of Biological Hazards of Environmental Pollutants*. Edited by S. S. Sandhu. Plenum Press, New York.

Ronco, A. & Díaz Báez, M.C. 2004. Interpretación y Manejo de resultados. En: *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*, Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones (Ed.: Castillo Morales, G.), México IMTA - Canadá IDRC.141-150 pp.

S

Salibián, A. 1992. Effects of deltamethrin on the south american toad (*Bufo arenarum*) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 616-621.

Salibián, A. & Marazzo, J. 1995. Studies on the Effects of Deltamethrin on Sodium Net Transport Through the *in vivo* Amphibian Skin. *Biom. Environ. Sci.*, 8:164-168.

Sánchez-Hernández, J.C. 2001. Wildlife exposure to organophosphorus insecticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 172: 21-63.

Sánchez-Hernández, J.C. 2003. Evaluating reptile exposure to cholinesterase inhibiting agrochemicals by serum butyrylcholinesterase activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 296-301.

Sánchez-Hernández, J.C. & Moreno-Sánchez, B. 2002. Lizard cholinesterases as biomarkers of pesticide exposure: enzymological characterization. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 2319-2325.

Sánchez-Hernández, J.C.; Carbonell, R.; Henríquez Pérez, A.; Montealegre, M. & Gómez, L. 2004. Inhibition of plasma butyrylcholinesterase activity in the lizard *Gallotia galloti palmae* by pesticides: a field study. *Environ. Pollut.*, 132: 479-488.

Samailoff, M. 1990. The nematodes toxicity assay using *Panagrellus redivivus*. *Toxicol. Assess.*, 5:309-318.

Scarlato, G. 1993. *Gestión ambiental de los humedales de la cuenca de la Laguna Merin: Un panorama sobre los conflictos y las respuestas*. Serie Documentos de Trabajo No. 84. Montevideo, CIEDUR. Uruguay.

Sheffield, S.R.; Sawicka-Kapusta, K.; Cohen, J.B. & Rattner, B.A. 2001. Rodentia and Lagomorpha. In: *Ecotoxicology of Wild Mammals* (Eds.: Shore, R.F. & Rattner, B.A.) John Wiley and Sons, West Sussex, U.K. pp. 215-314.

Shigehisa, H. & Shiraishi, H. 1998. Biomonitoring with shrimp to detect seasonal change in river water toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 687-694.

Soto, A.M.; Chung, K.L. & Sonnenschein, C. 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ. Health Perspect.* 102: 380-383.

Sower, S.A.; Reed, K.L. & Babbitt, K.J. 2000. Limb Malformations and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Frogs. *Environ. Health Perspect.* 108: 1085-1090.

Sparling, D.; Fellers, G. & McConnell, L. 2001. Pesticides and amphibian population's declines in California, USA. *Environ.Toxicol. Chem.* 20: 1591-1595.

Suk, W.A. & Wilson, S.H. 2002. Overview and future of molecular biomarkers of exposure and early disease in environmental health. En: *Biomarkers of Environmentally Associated Disease: Technologies, Concepts, and Perspectives* (Eds.: Suk, W.A. & Wilson, S.H.). CRC. Washington, DC, EEUU.

T

Takamura, K.; Nohara, S.; Kariya, T.; Okazaki, M. & Kinuko, I. 1991. Effects of pesticide contamination from rice fields on stream benthic arthropods. *Japan. J. Limnol.* 52, 95-103.

Trudeau, S. & Sans Cartier, G 2000. Métodos Bioquímicos Para Determinar la Actividad de Colinesterasa en Animales Silvestres Expuestos a Pesticidas. Reporte Técnico Serie No 338. Servicio Canadiense de Vida Salvaje, Casa Matriz, Hull, Québec, Canadá.

U

UE: Union Europea. 1984. Directive 84/449/EEC of 25 April 1984 adapting to technical progress for the sixth time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances.

U.S. USEPA., 1998. *Guidelines for Ecological Risk Assessment.* Risk Assessment Forum. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. EPA/630/R-95/002F.

V

Vanderkerken, K.; Vanparys, P.; Verschaeve, L. & Kirsch-Volders, M. 1989. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 4: 6-11.

W

Wake, D. B. 1994. Foreword. XV. In: *Measuring and monitoring biological diversity standar methods for amphibians* (Eds.: Heyer, R.W.; Donnelly, M.A.; McDiarmid R. W.; Hayk, L. A. C. & Foster, M.S.). Smithsonian Inst. Washington. USA. pp. 12-13.

Wikteliuss, S. & Edwards, C. 1997. Organochlorine Insecticide Residues in African Fauna: 1971-1995. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 151: 1-37.

WHO.,1989. *Environmental Health Criteria 82: Cypermethrin.* WHO/UN, Geneva.

X

Xu, Q. & Oldham, R.S. 1997. Lethal and sublethal effects of nitrogen fertilizer ammonium nitrate on common toad (*Bufo bufo*) tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32:298-303.

Z

Zakrzewski, S. F. 1991. *Principles of Environmental Toxicology.* ACS, Washington.

Zoll-Moreux, C, & Ferrier V. 1999. The Jaylet Test (Newt Micronucleus Test) and the Micronucleus Test In *Xenopus*: two in vivo tests on amphibia evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents. *Wat. Res.* 33: 2301-2314.

ANEXO I

Uso de Agroquímicos y la Salud del Trabajador Rural

El riesgo de *toxicidad crónica* se presenta con mayor frecuencia en los trabajadores rurales que desempeñan actividades agrarias, no obstante esto, sus efectos resultan difícil de demostrar (Hodgson y Levi, 1996). Aunque la información disponible es abundante, las limitaciones y dificultades para la identificación de los efectos crónicos de los plaguicidas son muchas, entre ellas: problemas en la valoración de la exposición, problemas en la determinación del efecto y, por último, problemas de diseño (Delgado Rodríguez, 2003). En este sentido, existen diversas asociaciones respecto a alteraciones en el sistema nervioso debido a la exposición a pesticidas órganofosforados y carbamatos, especialmente aquellas vinculadas a la neurotoxicidad de estos agentes, observadas por medio de efectos neurológicos retardados (Moreira y col., 2002). Una evaluación clínica y de biomarcadores de genotoxicidad, realizada en una población de niños y adultos del norte de Uruguay, expuestos a múltiples plaguicidas (Laborde y col., 2006), pertenecientes a una población que vive y trabaja en un entorno de distintos cultivos, entre ellos de arroz. Estos autores determinaron un severo impacto en la salud, que consistió en una mayor tendencia al daño genético en niños y en mujeres, lo que estaría en concordancia con el concepto de mayor vulnerabilidad infantil.

A manera de síntesis, la *toxicidad crónica* de los plaguicidas en humanos incluye diferentes efectos (Hodgson y Levi, 1996; Maroni y Fait, 1993; Delgado Rodríguez, 2003): carcinogénesis, neurotoxicidad, efectos reproductivos, sobre el desarrollo y efectos inmunológicos.

1. *Carcinogénesis*. Estudios preliminares sobre una amplia serie de plaguicidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas) parecen indicar que se trata de sustancias tóxicas, pero no buenos iniciadores tumorales a la vista de los resultados negativos o débilmente positivos en estudios genéticos. Sin embargo, mediciones bioquímicas e inmunoquímicas demostraron que estos agentes tienen un potencial efecto carcinogénico y promotor, pudiendo actuar en cualquiera de los múltiples niveles que existen en el proceso de carcinogénesis. Investigaciones recientes señalan procesos neoplásicos que pueden producir los plaguicidas sobre el hombre: cáncer de vejiga, de cerebro, mama, digestivo, hepático, pulmón, tejidos blandos, entre otros.

2. *Neurotoxicidad*. Los efectos neurotóxicos agudos y subagudos de la intoxicación por insecticidas órganofosforados más comunes son: síndrome colinérgico, síndrome intermedio y polineuropatía retardada. Por el contrario, aún no se conocen las posibles consecuencias neuropsicológicas

secundarias a la exposición a insecticidas. Así, se han descrito alteraciones transitorias en determinadas pruebas neuropsicológicas (esfera afectiva y destreza psicomotriz) que aparecían sólo durante la temporada de aplicación o manipulación de plaguicidas. El significado de estos síntomas inespecíficos no está del todo claro, ya que estudios de seguimiento de estos trabajadores semanas después de haber cesado la exposición a plaguicidas revelaban la ausencia de aquellos síntomas.

Existen estudios sobre los efectos crónicos de la intoxicación por organofosforados que han puesto de manifiesto algunos efectos a largo plazo, especialmente en la ejecución de funciones en las que están implicadas tanto el sistema nervioso central como el periférico, confirmando así anteriores hallazgos. Y, al mismo tiempo, hay que señalar que existen también estudios que indican que la exposición continua a bajas dosis de plaguicidas (especialmente compuestos organofosforados) no producen efectos significativos sobre la salud (Alavanja y col., 2004).

3. *Efectos reproductivos.* Una gran parte de los productos usados como plaguicidas tienen un efecto "disruptor" sobre la actividad endocrina (Choi y col., 2004). Xenobióticos estructuralmente similares a hormonas pueden actuar como agonistas o antagonistas de los receptores de hormonas endógenas. Los plaguicidas pueden presentar estos efectos, pero no a través de una exposición única durante el embarazo, sino por medio de pequeñas dosis continuas, capaces de acumularse en el tejido adiposo durante la vida de la mujer. En el embarazo, cuando la demanda nutricional aumenta, los depósitos de grasa se movilizan y las moléculas acumuladas en este tejido, incluyendo aquéllas con actividad disruptora endocrina, se vierten al torrente sanguíneo desde donde difunden a los tejidos diana. Cabe destacar que, en la provincia de Santa Fe, se han detectaron residuos de plaguicidas en leche materna (Lenardón y col., 2000); y mas recientemente en tejido mamario (Muñoz-de-Toro y col., 2006)

4. *Efectos sobre el desarrollo.* Se pueden presentar efectos adversos sobre el organismo en desarrollo, que pueden resultar de la exposición a plaguicidas de cualquier progenitor antes de la concepción, de la exposición de la madre durante el periodo gestacional o de exposiciones posteriores al nacimiento, durante la maduración sexual (Choi y col., 2004).

5. *Efectos inmunológicos.* Existen abrumadoras evidencias sobre la supresión en el sistema inmunológico provocada por la exposición a plaguicidas (ver Repetto y Baliga, 1996). Por ej. en trabajadores de una fábrica de India, expuestos habitualmente a diferentes plaguicidas, los niveles de linfocitos en la sangre, descendieron dos tercios por debajo de los niveles básicos y volvieron los índices normales una vez finalizada la exposición. De igual modo, en Moldavia -parte de la antigua Unión Soviética- los adolescentes de los pueblos con mayores tasas de uso de plaguicidas tenían índices varias veces más altos de infecciones respiratorias y digestivas que los adolescentes de otras zonas en las que la utilización de plaguicidas no era tan intensa. Entre 1960 y 1980 los índices de aplicación de plaguicidas por hectárea en las regiones agrícolas del centro y sur de Moldavia

superaban en casi 20 veces la media mundial. La supresión del sistema inmunológico por causa de los plaguicidas puede tener que ver también con el desarrollo de algunos tipos de cáncer.

Métodos propuestos

Dado evidencias experimentales que plantea medir distintos marcadores asociados a la exposición a sustancias agrotóxicas (Bolognesi, 2003; Pérez-Maldonado y col., 2004), se propone, en una primera etapa, considerar algunos biomarcadores de rutina. Acorde a los métodos propuestos por Laborde y col. (2006), se sugiere realizar una historia clínico-ambiental completa y un examen clínico a la población a evaluar. Dosificar los niveles de colinesterasa plasmática. Biomarcadores de genotoxicidad: ensayo cometa (versión alcalina) y el test de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos extraídos de sangre periférica. Análisis de la frecuencia de células apoptóticas (Pérez-Maldonado y col., 2004) y estimar la frecuencia de células apoptóticas en las muestras de sangre periférica empleando una tinción con el colorante supravital Hoechst 33342 para evidenciar morfología apoptótica.

1. Dosificar el nivel de colinesterasa plasmática.
2. Biomarcadores de genotoxicidad: ensayo cometa (versión alcalina) y el test de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos extraídos de sangre periférica.
3. Análisis de la frecuencia de células apoptóticas.

Diseño: (se consideran 3 grupos)

1. Trabajadores rurales de las arroceras, (expuestos a multitud de plaguicidas, en forma de mezclas complejas).

2. Pobladores potencialmente expuestos, (habitantes de áreas colindantes a las arroceras que no trabajen directamente en ellas).

3. Individuos controles, lo más cercano posible, y lo más similares a la población expuesta, con la diferencia esencial de la ausencia de exposición a plaguicidas y a cualquier otro compuesto con capacidad genotóxica.

Encuesta de rutina, (e.g. edad, sexo, lugar de residencia), preguntas relacionadas con el historial médico (enfermedades, anomalías genéticas, medicación, antecedentes familiares de cáncer, abortos espontáneo), con la ocupación previa y actual, actividades de ocio, dieta, hábitos de consumo

(alcohol, tabaco, café, drogas), exposiciones peligrosas (RX, productos cancerígenos, etc.), y cualquier otro factor que pudiera inducir daño genotóxico o interactuar con la exposición. Preguntas relacionadas con la actividad laboral: medidas de protección, productos utilizados, frecuencia de aplicación de plaguicidas, años de trabajo, accidentes de intoxicación, almacenamiento y preparación de los productos. El objetivo de la encuesta es detectar cualquier factor que pueda crear confusión con los resultados obtenidos.

Análisis estadístico. las distintas poblaciones evaluadas (expuestos y controles) se podrán contrastar con análisis estadísticos de rutina, paramétricos o no paramétricos, según corresponda (ej. Mann-Whitney test, Wilcoxon test, one-way ANOVA, Kruskal-Wallis test, etc) mediante los programas SPSS versión 10.0 (SPSS, Chicago, IL, EEUU) y SAS versión 8.0 (SAS, Cary, NC, EEUU). Para comparar medias y frecuencias para algunos factores demográficos, de la dieta, etc., se propone utilizar el test *t* de *Student*, el análisis de la varianza y la prueba de Ji-cuadrado.

Referencias

A

Alavanja, M.C.; Hoppin, J.A. & Kamel, F. 2004. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public. Health.* 25: 155-97.

B

Bolognesi, C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543 (3):251-72.

D

Delgado-Rodríguez, M. 2003. *Efectos crónicos de los fitosanitarios.* In: Respuesta ante las intoxicaciones agudas por plaguicidas. (Eds: Guillén, J. & Serrano, J.L.). Consejería de Salud de la Junta Andalucía, Sevilla, pp 87-96.

C

Choi, S.M.; Yoo, S.D. & Lee, B.M. 2004. Toxicological characteristics of endocrine disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity. *J. Toxicol. Environ. Health. B,* 7: 1–32.

H

Hodgson, E. & Levi, P.E. 1996. Pesticides: An important but underused model for the environmental health sciences. *Environ. Health. Perspect.,* 104: 97-106.

L

Laborde, A.; Martínez, L.; Martínez-López, W.; Méndez-Acuña, L.; Morador, M.J.; Fuster, T.; Sponton, F.; & Tomasina, F. 2006. Evaluación clínica y biomarcadores de genotoxicidad en una población de niños y adultos expuestos a múltiples plaguicidas *Acta Toxicol. Argent.* 14: 31-33.

Lenardón, A.; Maitre, M.I.; Lorenzatti, E. & Enrique, S. 2000. Plaguicidas organoclorados en Leche Materna en Santa Fe, Argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 8 (1): 2-4.

M

Maroni, M. & Fait, A. 1993. Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review of the 1975-1991 literature. *Toxicology,* 78: 1-180.

Moreira, J.C.; Jacob, S.C.; Peres, F.; Lima, J.; Meyer, A.; Oliveira-Silva, J.; y col., 2002. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo/RJ. *Ciência e Saúde Coletiva* 7 (2): 299-311.

Muñoz-de-Toro, M.; Beldoménico, H.R.; García, S.R.; Stoker, C.; De Jesús, J.J.; Beldoménico, P.M.; Ramos, J.G. & Luque, E.H. 2006. Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. *Environ Res.,*102 (1):107-12.

P

Pérez-Maldonado, I.N.; Díaz-Barriga, F., y col., 2004. DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children. *Environ. Res.* 94: 38-46.

R

Repetto, R. & Baliga, S.S. 1996. *Pesticides and the immune system: the public health risks.* Ed. WRI, Washington.