

Tesis para optar al título de Magíster en Ciencias Ambientales

**“Mapa predictivo de fuentes de contaminación difusa de fitosanitarios y
caracterización del impacto sobre las comunidades de anfibios, en una
microcuenca del Río Santa Lucía”**



Autora: Lic. María Magdalena
Carabio Foti

Tutores: Dr. Marcel Achkar y
Dr. Álvaro Soutullo

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores, Álvaro Soutullo y Marcel Achkar, por la confianza que depositaron en mí sin conocerme, para la realización de un trabajo de tesis innovador, que no respondía directamente a una línea de trabajo en la que alguno fuera experto sino que resultaba un desafío para todos.

A Guillermo Goyenola (CURE Maldonado, UdelaR) y Agustín Menta (Facultad de Ingeniería, UdelaR) por pasarme los piques para la modelación en SWAT, que fue compleja y desesperanzadora en ocasiones pero que gracias a ellos y una gran perseverancia, mediada por el apoyo constante de mis tutores, dio sus frutos.

A Julio Rodríguez Lagreca y Enrique Castiglioni por su ayuda en la elaboración de la lista de fitosanitarios a analizar, el manejo a indicar para la modelación y sus comentarios posteriores a los análisis en pos de la interpretación de los resultados.

A DINAMA por los análisis de las muestras de suelo. En particular a Natalia Barboza, Alejandro Mangarelli y Federico Souteras, por las reuniones previas de planificación y la confianza.

A Noelia Gobel y Beco Mautone por su ayuda en campo y a Gabriel Laufer por el préstamo de los materiales de muestreo.

A Valentina Franco por su ayuda en la construcción de los modelos en R®; Juan Barreneche por la asistencia en el uso de R® para el análisis de especies indicadoras; y Gabriel Perazza por la mano en la interpretación de los análisis estadísticos en general.

A Claudio Borteiro, Gabriel Laufer y Raúl Maneyro por sus aportes en relación a la lista de anfibios que se esperaba encontrar en la cuenca y la interpretación de la efectivamente hallada.

A la ANII, el Museo Nacional de Historia Natural y el Laboratorio de Desarrollo Sustentable y Gestión Ambiental del Territorio (IECA, FCien, UdelaR).

A Nacho, por estar conmigo, acompañándome siempre.

A mi familia y amigos en general...

A los amigos de Julana, que también son mi familia.

Finalmente, quiero agradecer especialmente a los miembros del tribunal, Lorena Rodríguez Gallego, Ricardo Barra y Gabriel Laufer, por sus correcciones y aportes en favor de este trabajo.

¡Gracias!

Índice

Resumen	5
Lista de acrónimos	6
Introducción	7
Objetivo	14
Objetivos específicos	14
Métodos	15
Área de estudio	15
Esquema general del proyecto	16
SWAT	17
Procedimiento	18
Etapa 1: Generación de insumos para el Modelo	18
Etapa 2: Modelación	20
Etapa 3: Campañas de campo	23
Muestreo dirigido a larvas	24
Muestreo dirigido a adultos	25
Etapa 4: Validación y análisis de resultados	25
Análisis morfométrico	27
Análisis de especies indicadoras	28
Resultados	30
Etapa 1: Generación de insumos para el modelo	30
Etapa 2: Modelación	31
Etapa 3: Campañas de campo	35
Etapa 4: Validación y análisis de resultados	39
Análisis morfométrico	45
Análisis de especies indicadoras	49
Discusión	50

Modelación en SWAT	51
Posibilidades de mejora de los datos de ingreso a SWAT	51
Fitosanitarios en suelo	53
Modelado en función de lo observado	55
Anfibios como indicadores	56
Composición de especies.....	57
Relación con usos del suelo	60
Perspectivas	64
Referencias	68
Anexos	82
Anexo I: Lista de especies de anfibios citadas para la región	82
Anexo II: Fichas de los fitosanitarios incluidos en la modelación	84
Anexo III: Compuestos sugeridos para su análisis	87
Anexo IV: Compuestos incluidos en los análisis de muestras de suelo	88
Anexo V: Imágenes de los puntos de muestreo.....	89
Anexo VI: Análisis complementarios de asociación entre sitios	93
Anexo VII: Modelos realizados para AM y ‘forma’ de <i>H. pulchellus</i>	95

Resumen

En los últimos años la agricultura de secano ha aumentado enormemente en Uruguay, pasando a dominar los cultivos de verano con la soja como principal componente. Esta agricultura posee una tendencia al monocultivo y a la intensificación mediante siembra continua, dependiente de fitosanitarios. Dichos productos, según sus características físico-químicas, pueden encontrarse en distintos compartimentos ambientales (suelo, agua, atmósfera y/o tejido animal), donde pueden degradarse, acumularse o experimentar alteraciones que disminuyan o aumenten su persistencia. En el presente trabajo se pusieron a prueba abordajes que pueden ser útiles para mejorar la gestión ambiental, en particular para el monitoreo de los impactos ambientales de los productos fitosanitarios, mediante la generación de un mapa predictivo de su destino ambiental representativo para una región y el empleo de un grupo altamente sensible como indicador biológico, como son los anfibios. Se modeló de manera exitosa el comportamiento del Glifosato en la cuenca del Arroyo de La Virgen (microcuenca del río Santa Lucía), generando a partir de la modelación en SWAT (Soil and Water Assessment Tool) un mapa de exportación-retención de dicho compuesto. A partir de muestras de suelo, se detectaron en la cuenca tres productos fitosanitarios de uso actual (Glifosato/AMPA, Cipermetrina y Clorpirifos) y cinco COPs (Clordano, Endosulfán, Hexaclorobenceno, Mirex y DDT). Respecto a los anfibios, los análisis sugieren que tanto sobre adultos como sobre larvas el Clorpirifos tiene un efecto negativo en la diversidad, al tiempo que el uso del suelo aparenta tener un efecto sobre la morfología de las larvas, incidiendo sobre el efecto que ciertos fitosanitarios provocan en ellas (efectos diferenciales por uso del suelo de AMPA y Glifosato). Este es el primer trabajo para nuestro país en abordar esta problemática con un enfoque integral, incorporando aspectos de análisis a escala de cuenca (con sensoramiento remoto y SIG), modelando de manera exitosa el comportamiento de fitosanitarios mediante el SWAT (de uso incipiente en Uruguay) y realizando relevamientos de campo y análisis estadísticos, que permitieron validar el modelo generado así como evidenciar posibles impactos de los fitosanitarios sobre un importante grupo de vertebrados, tanto a nivel comunitario como morfológico.

Palabras clave: fitosanitarios, modelo SWAT, anfibios, Santa Lucía

Lista de acrónimos

ACP: Análisis de Componentes Principales

AMPA: ácido aminometilfosfónico (producto de degradación de Glifosato)

CONEAT: Comisión Nacional de Estudio Agro-económico de la Tierra

COP: Contaminante Orgánico Persistente

CURE: Centro Universitario de la Región Este

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DEM: Modelo de Digital de Elevación (sigla en inglés)

DINAMA: Dirección Nacional de Medio Ambiente

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

IC: Intendencia de Canelones

MGAP: Ministerio de Ganadería Agronomía y Pesca

MNHN: Museo Nacional de Historia Natural

MSP: Ministerio de Salud

MVOTMA: Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente

NMDS: Escalamiento Multidimensional No Métrico (sigla en inglés)

OMS: Organización Mundial de la Salud

OSE: Obras Sanitarias del Estado

SNAP: Sistema Nacional de Áreas Protegidas

UdelaR: Universidad de la República

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

Introducción

Desde el año 2002 Uruguay ha transitado un proceso de intensificación y expansión agrícola, consecuencia de un aumento de la demanda en el mercado internacional, cambios tecnológicos y las medidas de política económica tomadas por Argentina (García-Préchac et al., 2010). Este proceso se basó en la expansión de la agricultura de secano, que para el año 2012 ocupaba 1:689.400 ha, una superficie que no alcanzaba desde 1957 (DIEA, 2012), y estaba dominada por cultivos de verano, básicamente a expensas de la soja (Souto, 2005; Arbeletche y Gutiérrez, 2010; Saavedra, 2010; Redo et al., 2012; Tiscornia et al., 2014). Los principales cambios tecnológicos asociados a esta 'nueva agricultura' son: la adopción de siembra sin laboreo, el empleo de cultivos transgénicos, el cambio de una agricultura basada en cultivos de invierno a una basada en cultivos de verano, la disminución de pasturas dentro de las rotaciones, la implementación de sistemas de agricultura continua y el desarrollo de sistemas agrícolas en nuevas zonas de producción, no tradicionalmente agrícolas (Souto, 2005; Arbeletche y Gutiérrez, 2010; García-Préchac et al., 2010; Saavedra, 2010). En síntesis, es esta una agricultura "diferente", con una tendencia al monocultivo e intensificación mediante siembra continua.

Entre 1961 y 2009, la superficie agrícola mundial creció un 12%, pero la producción agrícola aumentó un 150%, gracias al incremento significativo de los rendimientos de los principales cultivos (FAO, 2011). En América Latina, la producción agropecuaria aumentó más de 50% en el período de 2000 a 2012 (Acosta, 2013). A nivel de paisaje, por ejemplo, en Uruguay entre 2000 y 2011 se transformaron aproximadamente 1 millón de hectáreas de campo natural, con un incremento de alrededor de 450.000 ha de cultivos de secano y 460.000 ha de cultivo forestal (FAO, 2015).

El proceso de expansión de la agricultura en Uruguay ha influido positivamente en la economía, pero también a otros niveles ha generado consecuencias importantes, destacándose el desplazamiento de productores tradicionales, la conversión de tierras que tradicionalmente se empleaban para otro uso y el empleo de nuevas estrategias productivas, que implican un aumento en el uso de agroquímicos (fertilizantes y fitosanitarios) (Arbeletche y Gutiérrez, 2010; Terra Natero, 2016).

Los productos fitosanitarios son sustancias creadas para matar organismos que causan daños económicos en la producción agropecuaria, pero afectan también a organismos no blanco, incluyendo al ser humano (Ríos et al., 2010). Por esto, su uso inadecuado puede deteriorar la calidad de las fuentes de agua, alterar la reproducción y desarrollo de especies acuáticas y terrestres, y provocar diversas afecciones en humanos y otros animales (Gavrilescu, 2005; Mnif et al., 2011; Ortiz et al., 2011). Según la OMS cada año se producen en el mundo más de 25 millones de envenenamientos por productos fitosanitarios, en los cuales mueren alrededor de 20 mil personas. Por su parte, la FAO advierte que, si bien el 80% de los fitosanitarios que se distribuyen en el mundo son usados en países desarrollados, un 99% de las intoxicaciones ocurre en naciones en vías de desarrollo o subdesarrolladas (Muñoz Quesada, 2011).

Los suelos pueden recibir contaminantes ambientales por diferentes caminos, incluyendo la aplicación directa, deposición atmosférica, derrames, erosión desde áreas contaminadas próximas y por irrigación con aguas contaminadas, entre otros (Barra et al., 2005). Los procesos que influyen el comportamiento de los fitosanitarios en el suelo son: la descomposición (química, física y microbiana), la volatilización, el movimiento, el consumo por organismos y la adsorción (Bailey y White, 1970; van der Werf, 1996). Este último, a su vez, depende tanto de las características del compuesto como de las del suelo y puede ser desde totalmente reversible a irreversible (Morell y Candela, 1998; Gevaio et al., 2000). La adsorción controla entonces la persistencia de los fitosanitarios en el suelo, siendo el contenido de materia orgánica del compartimento el factor predominante para la retención (van der Werf, 1996; Boivin et al., 2005). Si bien en general los plaguicidas modernos tienden a tener poca persistencia en el ambiente (Núñez y Maeso, 2010a), los residuos de algunos compuestos pueden permanecer en el suelo por años. Por ejemplo, Dimond y Owen (1996) hallaron residuos de DDT en suelos forestales de Maine (USA) que no se fumigaban con dicho producto desde hacía al menos 30 años. En Uruguay, se han encontrado evidencias de residualidad de plaguicidas fuera del sitio de aplicación: presencia de herbicidas en agua y sedimento donde no se aplican (Eguren et al., 2008; Hill y Clérichi, 2008; Cantou et al., 2009; Nardo, 2011), presencia del herbicida atrazina en reservas de agua potable (Manta et al., 2013a), presencia de insecticidas en peces del Río Uruguay (Leites, 2009; Ríos et al., 2010; Colombo et al., 2011) y en producción apícola, en investigaciones donde se han utilizado apiarios como indicadores de calidad ambiental (Carrasco-Letelier et al., 2009; Ríos

y et al., 2010). Sin embargo, los estudios que analizan la presencia de fitosanitarios en diferentes matrices ambientales, en particular en suelo, continúan siendo escasos en el país.

Para modelar la dispersión de los fitosanitarios en el ambiente a menudo se utiliza lo que se denominan modelos ambientales. Estos son representaciones simplificadas de una cuestión de interés ambiental, con un componente matemático y uno espacial, generalmente integrados en un sistema de información geográfico (SIG). Algunos de ellos combinan datos de un área y un/os contaminante/s dados, para predecir su dispersión en el ambiente (Mackay, 2001). Dichos modelos son muy útiles como herramienta ya que permiten además evaluar el potencial impacto de los fitosanitarios en diferentes matrices ambientales (Bozzo y Corujo, 2010). En particular, SWAT (Soil and Water Assessment Tool), fue desarrollado por Arnold y colaboradores (1998) para el Servicio de Investigaciones Agrícolas (ARS) del departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA), para evaluar los efectos de decisiones alternativas de manejos agrícolas, sobre los recursos hídricos y la contaminación de fuentes no puntuales en cuencas hidrográficas. SWAT permite predecir el impacto de las prácticas de manejo de las cuencas sobre el agua y el suelo, en cuencas complejas con usos del suelo y condiciones de manejo variables a través del tiempo (Holvoet et al., 2005; Neitsch et al., 2009). Es un modelo muy popular en el estudio del impacto de las actividades agrícolas y la gestión del uso del suelo, en la salud general de las cuencas (Merwade y Rajib, 2014), empleándose incluso para modelar la provisión de servicios ecosistémicos, ya que permite tener una visión integrada de los ecosistemas en función de la gestión que se hace de los recursos naturales (Francesconi et al., 2016). Es interesante emplear este modelo en Uruguay debido a que, una vez calibrado y validado, permitiría el monitoreo de las actividades agrícolas sin los costos (en tiempo y dinero) de ir al campo y sería de ayuda en el ordenamiento territorial, permitiendo prever que impacto podría generar el cambio del uso del suelo en una región particular.

Si bien los modelos ambientales poseen los beneficios antes descriptos, necesitan ser complementados con otro tipo de estudios que permitan generar una visión integral de lo que ocurre en el ambiente. Para ello se utilizan comúnmente las especies indicadoras de calidad ambiental o susceptibles a los cambios.

Los anfibios que se reproducen en campos agrícolas están expuestos a niveles altos de fitosanitarios y pueden sufrir serias consecuencias a nivel poblacional (Peltzer et al., 2008). Estos organismos dependen de cuerpos de agua para su reproducción y desarrollo

temprano, por lo que podrían encontrarse expuestos a fitosanitarios durante esa etapa. Además, poseen una piel altamente permeable que los hace más susceptibles que otros vertebrados a las variaciones ambientales (Brühl et al., 2011; Ortiz y Egea, 2013; van Meter et al., 2014).

Según la lista roja de especies amenazadas de UICN, los anfibios representan el grupo de vertebrados más amenazados, con 32% de las especies en peligro de extinción y 43% en situación de declive. Asimismo, el número de anfibios catalogado como en peligro crítico se ha duplicado desde la década de los '80 (Stuart et al., 2004), década desde la cual se registra un declive mundial de anfibios (catalogado como una de las amenazas más críticas a la biodiversidad global). Los cambios en los usos del suelo han sido reportados como una de las causas de este declive mundial (Stuart et al., 2004; Wake y Vredenburg, 2008; Brum et al., 2013; Loyola et al., 2015; Nori et al., 2015). Si se considera la extensa superficie que se utiliza para la agricultura, la expansión agrícola representa la actividad humana que genera las mayores pérdidas de hábitat utilizable para los anfibios a nivel global (Mann et al., 2009; Nori et al., 2013). En Uruguay, la pérdida y modificación del hábitat ha sido citada como la principal amenaza que afecta de forma general a los anfibios (Soutullo et al., 2013). Sobre la base de los criterios de UICN, Carreira y Maneyro (2015) reportaron para nuestro país que 12 especies se encuentran en alguna categoría de amenaza: tres en peligro crítico (CR), ocho en peligro (EN), una vulnerable (VU) y cuatro casi amenazadas (NT), sobre un total de 46 especies nativas.

De Lange y colaboradores (2009) encontraron que, entre siete taxones de vertebrados, los anfibios y reptiles contenían las especies más vulnerables a nivel poblacional, en relación a la exposición a fitosanitarios (DDT y Clorpirifos); mientras que Davidson y Knapp (2007) encontraron una correlación entre el uso intensivo de fitosanitarios y el declive de las poblaciones de anfibios. A su vez, existen diversos estudios que demuestran la toxicidad de varios productos empleados en la agricultura moderna sobre especies de anfibios (Lajmanovich et al., 2009; Lescano et al., 2009; Lajmanovich et al., 2011; Huespe, 2015). Se registraron efectos sobre la supervivencia y el desarrollo de larvas (Relyea, 2003; Relyea, 2004a; Relyea, 2005) e incluso morfologías anormales producto de mutaciones genéticas (Blaustein y Johnson, 2003; Taylor et al., 2005; Peltzer et al., 2011; Agostini et al., 2013). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos son experimentos de laboratorio centrados en un producto a la vez, impidiendo una evaluación tanto de los efectos directos e indirectos de los

fitosanitarios sobre los organismos inmersos en sus contextos ecológicos naturales (Relyea, 2005; Relyea et al., 2005), como de los posibles efectos resultantes de la interacción entre productos (Relyea, 2009).

Los fitosanitarios, además de causar un daño directo, pueden interactuar con otros causantes de estrés. Por ejemplo, la exposición a estos productos puede ser un importante supresor del sistema inmune de los anfibios, facilitando así la aparición de enfermedades infecciosas como la quitridiomicosis (otra de las principales causas del declive mundial), resultando en la reducción del fitness del adulto o directamente causando mortalidad (Brühl et al., 2011; Lips, 2016).

En los hábitats terrestres, los anfibios se encuentran expuestos a productos químicos cuando se mueven a través de campos agrícolas en busca de alimento y sitios de reproducción. Los anfibios en el medio terrestre obtienen el agua principalmente por absorción cutánea. Así, además de la exposición directa, estos organismos pueden estar expuestos a la contaminación con fitosanitarios cuando cruzando campos agrícolas están en contacto con el suelo o plantas que los contienen (Brühl et al., 2011).

Una forma de determinar el impacto de los fitosanitarios sobre un sitio dado es la evaluación “in situ” del efecto sobre las comunidades bióticas que lo habitan. Esta es una evaluación “a posteriori” y nos da una indicación de la vulnerabilidad del agroecosistema (Núñez y Maeso, 2010b). En cultivos de verano el principal período de aplicación de fitosanitarios (noviembre-marzo) coincide con el período reproductivo de la mayoría de las especies de anfibios de la región (Achaval y Olmos, 2007; Peltzer y Lajmanovich, 2007). Los charcos representan muestras no aleatorias de una comunidad regional, de forma tal que las características de las comunidades de anfibios presentes en cada charco dependen tanto de su contexto ecológico (e.g. características físicas y químicas del charco, presencia de competidores y depredadores, disponibilidad de recursos), como del uso del suelo circundante (principalmente por exposición a productos fitosanitarios) (Knutson et al., 2004; Relyea et al., 2005).

Por otra parte, considerando como bioindicador a un organismo (o parte de un organismo o de una comunidad) que contiene información sobre la calidad del ambiente (Markert et al., 2003), resulta ventajoso para el desarrollo de planes de monitoreo, identificar especies bioindicadoras de la presencia (actual o pasada) de fitosanitarios en un sitio. Las tablas de

presencia-ausencia permiten evidenciar especies tolerantes y sensibles a los productos en cuestión. Si una especie resulta ser muy sensible, su ausencia de un sitio donde “debería estar” puede considerarse como un indicador de la presencia de dichos productos, del mismo modo que si una especie es tolerante a un compuesto y solo se encuentra esa especie en donde se debería encontrar mayor diversidad, se puede tomar como alerta. Así, siempre que se tenga controlados los restantes determinantes ambientales que podrían afectar la presencia de las especies en cuestión, su presencia o ausencia podrían emplearse como indicador. El empleo de bioindicadores puede reflejar efectos de la contaminación sobre los componentes vivos de los ecosistemas y tiene la capacidad de evidenciar impactos toxicológicos tanto agudos como crónicos (de corto y largo plazo), denotando las consecuencias de diversas sustancias cuyas concentraciones varían en el tiempo y el espacio (Maggioni et al., 2012).

Los anfibios, dado su ciclo de vida y su piel altamente permeable están expuestos tanto a contaminantes en el medio acuático como en el terrestre, lo que aumenta sus posibilidades de afectación (Brühl et al., 2011). Además, en su etapa larval están fuertemente condicionados a su entorno, ya que habitan en el medio acuático (no pueden trasladarse de un cuerpo de agua a otro) y sufren cambios dramáticos conforme avanza su metamorfosis. Por estas razones, los anfibios pueden resultar una herramienta útil de alerta temprana, de bajo costo, fácil de muestrear y de análisis rápido y directo (Blaustein y Johnson, 2003). Diversos autores han citado a este grupo de vertebrados como excelentes bioindicadores de la calidad ambiental (e.g., Brühl et al., 2013). Por ejemplo, Welsh y Ollivier (1998) evaluaron las diferentes densidades de anfibios nativos como indicador de estrés en arroyos, tras la introducción accidental de sedimentos finos en el ecosistema en un parque nacional de Estados Unidos. Estos autores encontraron que la densidad de anfibios era significativamente menor en los sistemas contaminados y afirman que el efecto fue especie-específico, asociándolo a la dependencia de ciertos microhábitats afectados en mayor o menor medida. Por otra parte, Davidson (2004) analizó la asociación entre los patrones espaciales de disminución de cinco especies de anfibios de California (basado en mapas de distribución pasada y actual de las especies) y los patrones históricos de uso de fitosanitarios, por un período de 17 años, encontrando en 4 de las 5 especies una fuerte correlación entre la presencia de fitosanitarios y la disminución de la población.

Entre las nuevas regiones ocupadas por cultivos de secano en Uruguay se encuentra la cuenca del Río Santa Lucía, donde se prevé que la superficie con agricultura extensiva, puede aumentar un 7,6% para 2030 (llegando a cubrir el 23,8%) aumentando principalmente el rubro sojero (Achkar et al., 2012). A su vez, en el contexto de los reclamos por la calidad del agua potable suministrada por OSE en el área metropolitana de Montevideo, la UdelAR presentó un informe (Manta et al., 2013b) evidenciando la escasez de información sobre el uso de fitosanitarios y planteando como prioridad conocer la carga de dichos productos en cada porción de la cuenca. En línea con esto, el MVOTMA propuso declarar como zona prioritaria de la cuenca al Río Santa Lucía aguas arriba de la confluencia con el San José, Santa Lucía Chico, Arroyo de La Virgen, Río San José, Arroyo Canelón Grande y Arroyo Canelón Chico, y exigir a todos los padrones rurales ubicados en dicha cuenca, el control de la aplicación de nutrientes y fitosanitarios (MVOTMA, 2013).

En los últimos años la coyuntura interna respecto a la agricultura ha cambiado. Con el objetivo de conservar el recurso suelo, a partir del año 2012 el MGAP puso en práctica la ley de uso y conservación de suelos. El marco normativo prevé que tanto el propietario como el agricultor arrendatario son responsables del uso que se le da a la tierra (Terra Natero, 2016). Además, entre las medidas anunciadas en 2013 se incluía que todos los padrones rurales de la cuenca del río Santa Lucía debían presentar su plan de manejo (implementación aún en proceso) y que debían dejarse áreas de amortiguación sin laboreo ni aplicaciones de fitosanitarios entre predios. En relación a esto la IC y el MVOTMA (DINAMA) establecieron un convenio para mejorar la gestión ambiental, que incluye la formulación de indicadores y el diseño de estrategias conjuntas para el monitoreo y control ambiental (IC, 2016) y ambos organismos dinamizaron el mecanismo de denuncias pudiéndose ahora denunciar a través de los portales de ambas instituciones (mvotma.gub.uy/denuncias; [imcanelones.gub.uy/servicios/\(...\)/denuncia-medio-ambiente](http://imcanelones.gub.uy/servicios/(...)/denuncia-medio-ambiente)). A esta coyuntura interna se suman la reducción internacional de los precios de los granos y las variaciones en los costos de producción y transporte hacia los puertos. Todos estos factores combinados incidieron en una disminución relativa en el área agrícola, en zonas no tradicionales, que se acentuó en la última zafra. Por lo tanto, si bien se preveía que aumentara la superficie sojera, su comportamiento es dependiente de la coyuntura internacional, con variaciones en el mediano plazo.

En síntesis, los fitosanitarios pueden comportarse de diferentes maneras en el interior de una cuenca determinada, por ejemplo pueden quedar retenidos en el suelo o llegar por escorrentía o deposición directa a los cuerpos de agua. Los organismos que viven en, o asociados a, estos cuerpos de agua pueden verse afectados, tanto a nivel comunitario como individual, por la presencia de estos productos. Por lo expuesto, el presente trabajo se propuso el estudio del comportamiento de ciertos productos fitosanitarios en una cuenca específica, a través de un abordaje ecosistémico (i.e. que contempla cambios en la estructura y función de los componentes bióticos y abióticos; Likens, 1992); incorporando en un mismo estudio un modelo ambiental de distribución de fitosanitarios, determinaciones en suelo y el empleo de indicadores biológicos (anfibios). Se buscó aportar insumos para el monitoreo y el ordenamiento territorial de las actividades agrícolas, siendo el primer caso a nivel nacional de un abordaje ecosistémico del problema y desarrollándose en una cuenca estratégica para el país como lo es la del Río Santa Lucía.

Objetivo

Poner a prueba abordajes metodológicos para la identificación de fuentes de contaminación difusa de fitosanitarios y el monitoreo de los impactos de estos en la biota, como insumo para el monitoreo de las actividades agrícolas, el ordenamiento territorial y el diseño de estrategias productivas.

Objetivos específicos

- 1) Generar un mapa predictivo de fuentes de contaminación difusa de fitosanitarios para la cuenca del Arroyo de La Virgen (microcuenca del Río Santa Lucía).
- 2) Comparar los ensambles de anfibios presentes en sitios expuestos a diferentes concentraciones de fitosanitarios, y evaluar si existen asociaciones entre la exposición a dichos productos y parámetros comunitarios, y atributos morfológicos de los individuos.
- 3) Identificar especies de anfibios con potencial para ser utilizadas como indicadoras de la presencia de concentraciones elevadas de fitosanitarios en el ambiente.

Métodos

Área de estudio

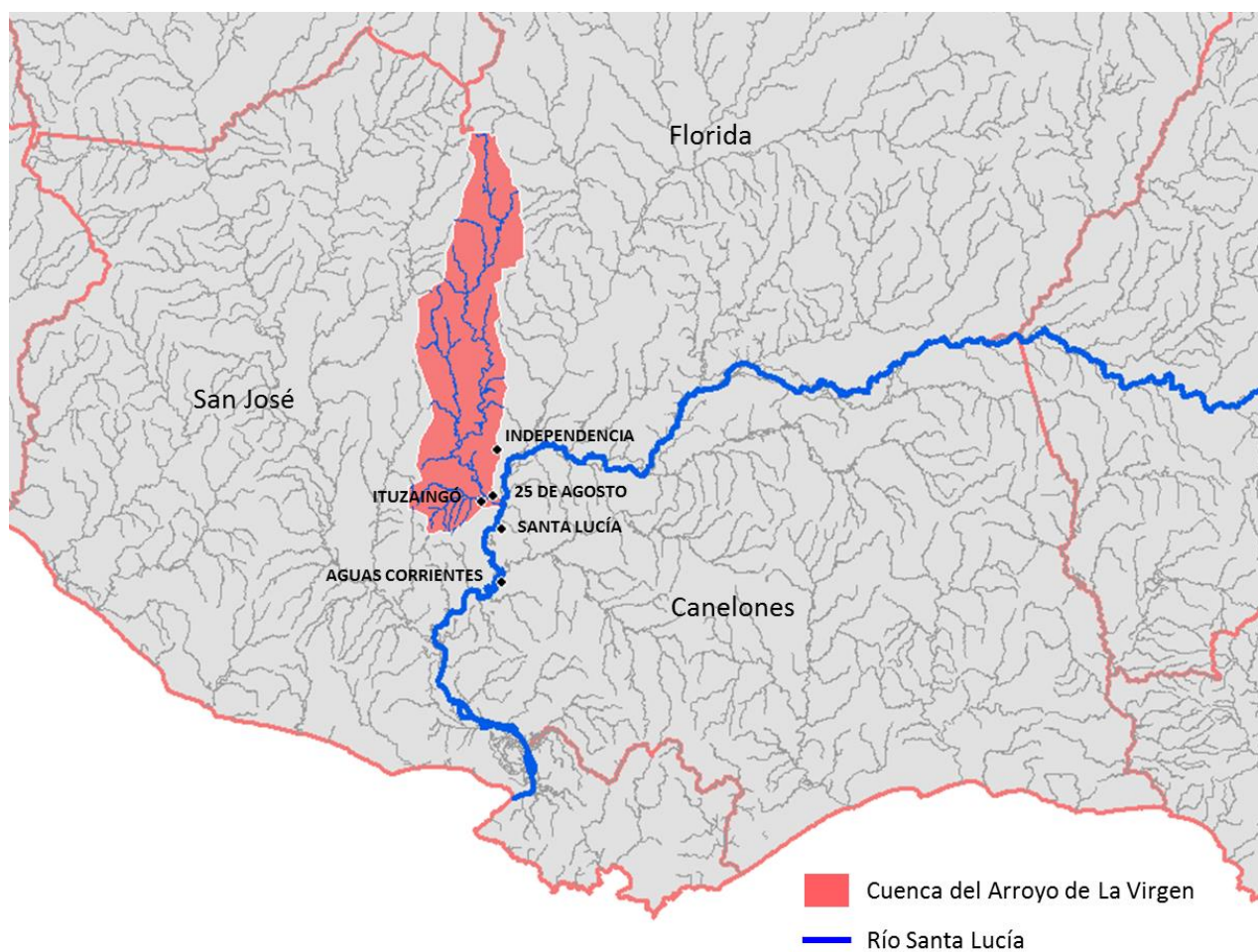


Figura 1. Ubicación de la Cuenca del Arroyo de La Virgen.

El arroyo de La Virgen nace en la Cuchilla Grande Inferior y desemboca en el Río Santa Lucía, próximo a las localidades de 25 de Agosto e Ituzaingó. Durante parte de su recorrido oficia de límite departamental entre los departamentos de Florida y San José. Desemboca aproximadamente 3km lineales aguas arriba de la ciudad de Santa Lucía y a menos de 10km lineales de Aguas Corrientes (toma de agua de OSE) (Fig. 1). La longitud recta naciente-desembocadura es aproximadamente 50km, y el recorrido es de unos 70km. El área aproximada de la cuenca ronda las 44.600ha. Esta cuenca forma parte de la cuenca del Río Santa Lucía, la cual es estratégica, dado que abastece de agua a cerca del 60% de la población del país (Montevideo y parte del área metropolitana) (DINAMA, 2009).

Según los análisis realizados a partir de imágenes satelitales, revisión bibliográfica (Baeza et al., 2011) y salida de campo de reconocimiento, en la cuenca de estudio pueden

reconocerse 3 regiones según los usos del suelo: superior, próxima a las nacientes, dónde la principal cobertura es campo natural; media, que presenta agricultura y pasturas artificiales; y baja, dominada por agricultura intensiva.

Están citadas para la región (departamentos de Florida, Canelones y principalmente San José) 30 especies de anfibios (Achaval y Olmos, 2007), de las cuáles, según sus hábitos, 16 son factibles de encontrarse en la zona (3 de ellas son de reproducción explosiva luego de copiosas lluvias) (ver lista completa en Anexo I). De estas 16, una (*Physalaemus fernandezae*) está catalogada como prioritaria para la conservación en Uruguay, y como una de las especies prioritaria para ser representadas dentro del SNAP (Soutullo et al., 2013).

Esquema general del proyecto

Un esquema general del abordaje metodológico del proyecto puede verse en la Figura 2, donde se muestran las diferentes etapas del mismo y con qué acciones se corresponden.

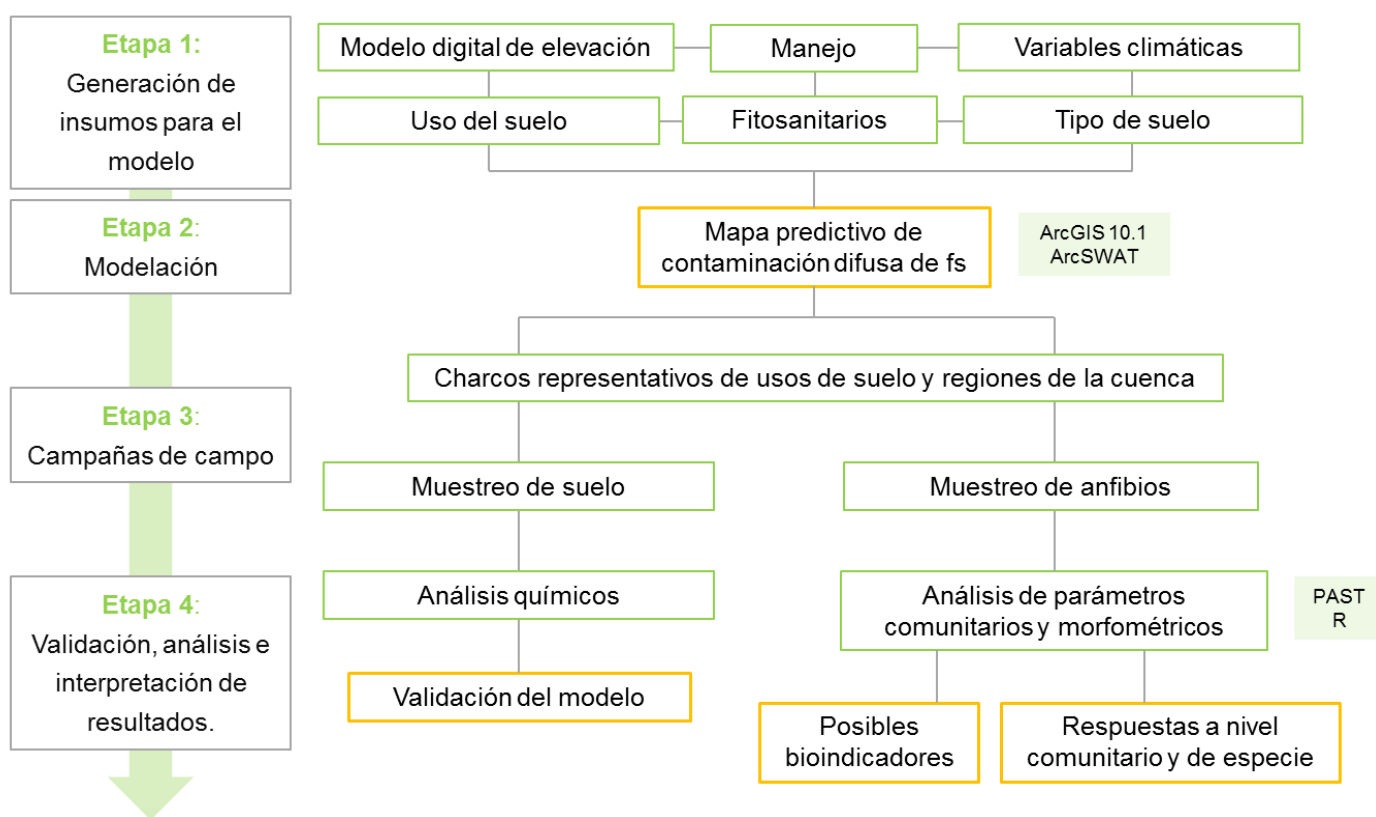


Figura 2. Esquema general del proyecto. A la izquierda: etapas del proyecto; en recuadros verdes: actividades; en recuadros anaranjados: resultados.

Este proyecto implicó la elección de una herramienta de modelación que permitiera generar un mapa predictivo de contaminación difusa, lo más completo posible (integrara la mayor parte de las condiciones ambientales posibles, i.e. hidrografía, clima, pendiente, etc.) pero sin dejar de ser de uso sencillo y generalizado. Luego de una etapa de revisión bibliográfica, se optó por utilizar el Soil and Water Assessment Tool (SWAT).

SWAT

Este programa incorpora ecuaciones de regresión para describir las relaciones entre sus variables de entrada y salida. Requiere información específica acerca del clima, propiedades del suelo, topografía, vegetación y prácticas de manejo. Los procesos físicos asociados al movimiento del agua, movimiento de sedimentos, crecimiento de cultivos, ciclado de nutrientes, etc. son modelados directamente por SWAT usando estos datos de entrada (Neitsch et al., 2009; Arnold et al., 2012).

SWAT ha sido aplicado satisfactoriamente en la modelación del transporte de productos fitosanitarios a escala de cuenca hidrográfica y ha sido recomendado para ser aplicado en cuencas donde predomina la agricultura (Borah y Bera, 2004; Holvoet et al., 2007). El uso de SWAT está bien documentado y su empleo para simular el transporte de fitosanitarios se está incrementando (Bannwarth et al., 2014), habiendo sido aplicado satisfactoriamente para la simulación del comportamiento de dichos productos en regiones templadas (Ramanarayanan et al., 2005; Larose et al., 2007; Luo y Zhang, 2009). SWAT simula el movimiento de los fitosanitarios vía escorrentía superficial (en solución y adsorbidos a los sedimentos transportados por la escorrentía), y dentro del perfil del suelo y hacia acuíferos vía percolación (en solución). Las ecuaciones empleadas para simular el movimiento de éstos en la cuenca fueron tomadas del modelo GLEAMS (Groundwater Loading Effects of Agricultural Management Systems) (Leonard et al., 1987). El movimiento de los fitosanitarios está determinado por su solubilidad, su vida media y su coeficiente de adsorción a la materia orgánica del suelo. Los fitosanitarios en el follaje de las plantas y en el suelo se degradan exponencialmente de acuerdo con su vida media; su transporte por agua y sedimentos se calcula para cada evento de escorrentía y su lixiviación se estima para cada capa del suelo cuando ocurre la percolación (Holvoet et al., 2005; Neitsch et al., 2009).

Para su modelación, la cuenca de drenaje se divide en subcuencas y estas a su vez en un número de subunidades homogéneas (unidades de respuesta hidrológica o HRUs, por su sigla en inglés) que tienen propiedades únicas de tipo y uso del suelo. La información de entrada de cada subcuenca es agrupada en categorías de clima; cobertura vegetal, suelo y manejo. La carga y el movimiento del agua de escorrentía, la carga de sedimentos, nutrientes y fitosanitarios hacia el canal principal en cada subcuenca es simulado considerando el efecto de los procesos que influyen su hidrología.

SWAT, en su presentación original, es un programa basado en códigos, que puede resultar de difícil empleo. ArcSWAT (Winchell et al., 2007) es una extensión de ArcGIS-ArcView, que facilita su uso al ser una interface de entrada gráfica para el usuario del modelo SWAT.

Procedimiento

Etapas 1: Generación de Insumos para el Modelo

En primer lugar se realizó la delimitación de la cuenca a partir del uso de un Modelo Digital de Elevación (DEM, por su sigla en inglés). El DEM se generó a partir de la información de curvas de nivel, de las cartas topográficas 1:50.000 del Servicio Geográfico Militar (SGM, 1987) y del Modelo Digital de Superficie (MDS) (NASA ASTER, 2006), con una resolución de 90 m.

Para la elaboración de la carta de usos del suelo se utilizó una imagen satelital Landsat 8 223/84, del 24 de marzo de 2014, resolución espacial 30x30 metros, obtenida gratuitamente del sitio web del Instituto Nacional De Pesquisas Espaciais (INPE, 2014) de Brasil y el procesamiento se realizó utilizando el software ArcGIS®10 (ESRI, 2011). La corrección geométrica de la imagen se resolvió en el proceso de georreferenciación de imágenes en el sistema Universal Transversal Mecartor - 21 S (UTM 21S), que constituye el sistema de proyecciones de base del SIG elaborado. La clasificación de usos y coberturas del suelo se realizó mediante técnicas de teledetección, para ello se utilizó la integración de las bandas 4 (rojo), 5 (infrarrojo cercano) y 6 (infrarrojo medio), ordenándolas como 2-3-1 (rojo, verde, azul). En el procesamiento de las imágenes se integraron clasificaciones basadas en objetos y regiones, como la segmentación de imágenes, y clasificaciones automáticas basadas en

celdas individuales, como las clasificaciones supervisadas y no supervisadas (Jensen, 2007; Chuvieco, 2008).

La clasificación supervisada, se realizó utilizando polígonos de referencia (relevados en una primera salida de campo) para cada una de las clases de entidad. Una vez finalizada dicha clasificación se sistematizó los resultados, fusionando los polígonos adyacentes que tuvieran el mismo uso de suelo y posteriormente se lo corrigió a partir de una salida de campo de reconocimiento (octubre de 2014). Dado que la escala de la cuenca lo permite, se verificaron la totalidad de los usos y se corrigieron los errores de clasificación con información de terreno. La leyenda de usos del suelo trabajada fue: agua, monte nativo, cultivo, forestación, campo natural y urbano. Dentro de 'cultivo' se incluyeron los predios que se encontraban como suelo desnudo en el momento de la clasificación y predios tanto agrícolas como con praderas implantadas, ya que ambos implican la sustitución total de la cobertura vegetal.

A continuación se generó la capa correspondiente a tipos de suelo, a partir de la carta de unidades de suelos CONEAT (MGAP, 1994), realizando una equivalencia entre la clasificación de suelos empleada en Uruguay y la empleada por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) (Durán et al., 1999). La equivalencia con los grupos de suelo que se encuentran en la base de datos de SWAT se realizó según revisión de las características de los tipos de suelo USDA que dominan en cada grupo de suelo.

Según los tipos de cultivos de verano detectados (principalmente soja y maíz) se seleccionaron para su inclusión en la modelación los fitosanitarios más corrientemente empleados en ellos: Glifosato (herbicida genérico no selectivo) y Clorpirifos (insecticida organofosforado, inhibidor de la acetilcolinesterasa) (ver fichas en Anexo II). Estos productos debían además cumplir con los requisitos de poder ser detectados en muestras de suelo y mediante los análisis que fuera capaz de realizar el Departamento Laboratorio Ambiental de DINAMA, laboratorio al cual se remitieron las muestras. Tanto la lista de fitosanitarios frecuentemente empleados en los cultivos de soja y maíz (Anexo III), como el manejo de los cultivos que se debía asumir al momento de modelar fueron determinados a partir de consultas a dos expertos: Ing. Agr. Msc. Julio Rodríguez Lagreca (asesor en Recursos Naturales, Unidad de Gestión de Proyectos, MGAP) e Ing. Agr. Dr. Enrique Castiglioni (Facultad de Agronomía, Entomología y Agroecología, CURE, Rocha). El Ing. Agr. Msc. Julio Rodríguez Lagreca refirió además cuántas aplicaciones y en qué cantidad se realizan según

el tipo de cultivo. Se tomó como valores promedio 2 aplicaciones de Glifosato y dos de Clorpirifos.

Etapas 2: Modelación

A continuación se procedió a trabajar en la interface ArcSWAT. Esta requiere de ArcGIS®10 (ESRI, 2011) y del software ArcSWAT, que fue descargado de la página web del proyecto (SWAT).

En primer lugar se completó el módulo “Delimitación de la cuenca”, para lo cual la información requerida es el DEM.

En segundo lugar, se completó el módulo “Land use/Soils/SlopeDefinition”, dónde deben ingresarse al proyecto los datos correspondientes a usos del suelo y tipo de suelo así como indicar cuántas categorías de pendiente se utilizarán (pendientes que el modelo calculará a partir del DEM). Los usos del suelo fueron ingresados según la base de datos del modelo: agua, 'Forest evergreen' (monte nativo), 'Agriculture land generic' (cultivo); 'Eucalyptus' (forestación), 'Range grasses' (campo natural) y urbano. De los 4 grupos de suelo resultantes de la equivalencia, dos se encontraban en la base de datos del programa (Charles y Palatine) mientras que los otros dos (Tetonka y Sharpsburg) fueron ingresados manualmente. Los datos requeridos para esto fueron extraídos de la carta de suelos CONEAT (MGAP, 1994).

A continuación se habilita la creación de las HRUs. Aquí el usuario tiene dos opciones: asignar a cada subcuenca una o múltiples HRUs. De optarse por la primera opción la HRU es determinada por el uso de suelo dominante en la subcuenca, de optarse por la segunda, debe indicarse a partir de qué porcentaje de superficie deben considerarse los usos de suelo que determinarán las HRUs. Se optó por la opción de múltiples HRUs por subcuenca, indicando que se consideraran los usos de suelo que tuvieran una superficie por encima del 5% del total de la cuenca (i.e. no se generaron HRUs que considerasen los usos ‘agua’ o ‘forestación’, por ocupar estos menos del 5% del área de la cuenca).

Luego se procedió a ingresar los datos de clima. En el presente estudio, se emplearon datos obtenidos a partir del simulador CMIP3 (The downscaled global climate model simulations) desarrollado por 'The Nature Conservancy' para el Banco Mundial (Thrasher et al., 2012; Girvetz et al., 2013) y disponible en la web del proyecto SWAT. No se emplearon datos reales

debido a que no se contaba con todos los datos requeridos para ingresar al modelo (precipitación, temperatura, radiación solar, velocidad del viento y humedad relativa) para la totalidad del período de tiempo a modelar.

Seguidamente se indicó el manejo que se hace de las subunidades de uso agrícola. Las características químicas y medioambientales de los ingredientes activos de cada producto, requeridas para modelar su comportamiento ambiental, se encuentran en la base de datos del modelo, basado en las siguientes formulaciones comerciales: Lorsba® (Clorpirifos) y Roundup® (Glifosato). Según los datos brindados por los fabricantes, la formulación más extendida de Roundup® contiene 540 g/l y la de Lorsba® 480 g/l, por lo cual se indicó para cada aplicación de Glifosato el valor de 1.64 kg/ha (3l de producto comercial) y 0.48 kg/ha (1l de producto comercial) de Clorpirifos.

Para todos los predios incluidos en la categoría ‘Cultivo’, se aplicó el mismo manejo (Tabla 1), que incluyó dos aplicaciones de Glifosato y dos de Clorpirifos en cantidades constantes. Se consideró un escenario donde anualmente el ciclo es: cultivo de verano (octubre-abril), cultivando todo el suelo cultivable, y descanso el resto del año (mayo-setiembre).

Tabla 1. Manejo indicado para las HRUs con uso del suelo ‘Cultivo’, al modelar en SWAT.

Año	Mes	Operación
1	10	Aplicación de Glifosato
	10	Comienzo del crecimiento
	12	Autofertilización
	12	Aplicación de Clorpirifos
2	1	Aplicación de Glifosato
	2	Aplicación de Clorpirifos
	4	Cosecha

A continuación se habilitó el módulo “Crear tablas SWAT” y, finalmente, se corrió el modelo. Para esto último debe indicarse el período de tiempo para el cual se quiere la modelación. Se realizaron diversas corridas del modelo: para la cuenca entera y por subcuenca con dato medido y para cuatro períodos de tiempo diferentes.

Posteriormente deberían realizarse la calibración del modelo y su consiguiente validación, a fin de obtener estimaciones de concentraciones que se ajusten a la realidad de la cuenca (Neitsch et al., 2002; Bannwarth et al., 2014). Para ello se requiere de un gran número de datos medidos, se debe contar con dos set de datos (uno para calibrar y otro para validar), de preferencia que abarquen datos de todos los parámetros a estimar y en particular de clima para años húmedos, medios y secos (Arnold et al., 2012). Dado que no se contó con datos para realizar la calibración del modelo y su posterior validación, la calibración no se realizó, por lo cual el modelo fue validado de forma cualitativa. Por lo tanto, las concentraciones de productos que SWAT arrojó no son consideradas como concentraciones esperables de hallar en la cuenca. El análisis que se hace en el presente trabajo es entonces de tendencias; o sea, que se cumpla que para aquellos casos en que el modelo predice que habrá mayores concentraciones efectivamente haya más y viceversa.

A partir de las tablas obtenidas como output del modelo corrido para la cuenca completa, se generó un mapa de exportación de fitosanitarios para cada producto y se realizó un “análisis de punto caliente”, empleando el software ArcGIS®. Este análisis, dado un conjunto de entidades (píxeles) y un campo de análisis (área de estudio), identifica puntos calientes y puntos fríos estadísticamente significativos mediante el estadístico G_i^* de Getis-Ord (Getis y Ord, 1992). Esta herramienta funciona mediante la búsqueda de cada entidad dentro del contexto de entidades vecinas. Una entidad con un valor alto es interesante, pero para ser un punto caliente estadísticamente significativo, dicha entidad debe tener un valor alto y también estar rodeada por otras entidades con valores altos. La suma local para una entidad y sus vecinos se compara proporcionalmente con la suma de todas las entidades; cuando la suma local es muy diferente de la esperada, y esa diferencia es demasiado grande como para ser el resultado de una opción aleatoria, se obtiene como consecuencia una puntuación z (estadístico G_i^*) estadísticamente significativa. Para las puntuaciones z positivas que son estadísticamente significativas, mientras más grande es la puntuación z , más intenso es el clustering de valores altos (punto caliente). Para las puntuaciones z negativas que son estadísticamente significativas, mientras más pequeña es la puntuación z , más intenso es el clustering de valores bajos (punto frío). Por lo tanto, las puntuaciones z y los valores P resultantes indican dónde se agrupan espacialmente las entidades con valores altos o bajos (Winchell et al., 2013). En este trabajo, se tomó como límite aceptable de significancia: p -valor menor a 0,10 y se interpretó las zonas de la cuenca con alto z como zonas de alta exportación hacia el arroyo, con una contribución desproporcionadamente alta de

contaminación difusa (i.e. fuentes de contaminación difusa); en cambio las zonas con muy escasa exportación se interpretaron como potenciales sumideros de fitosanitarios, donde es de esperar condiciones locales de alta contaminación.

Etapa 3: Campañas de campo

Con el objetivo de obtener información de campo que permitiera validar cualitativamente los resultados obtenidos a partir del modelo SWAT, se realizaron dos campañas de campo: la primera en diciembre de 2014, donde los cultivos de verano se encontraban en una etapa temprana de su crecimiento, y la segunda en marzo de 2015, próximo a la cosecha.

En el interior de la cuenca de estudio se determinaron sistemas lénticos de mediano tamaño (charcos), considerando que se encontraran a una distancia tal del cauce del arroyo que garantice que este no influye sobre su dinámica. A partir de ello, se seleccionaron para su muestreo 11 charcos: 3 insertos en una matriz de cultivos, 5 de pradera artificial y 3 de campo natural. En todos los casos se seleccionaron charcos en apariencia permanentes, en su mayoría tajamares que sirven o sirvieron como abrevaderos para el ganado. De forma genérica en los suelos de nuestro país la materia orgánica se concentra en los primeros 20cm (Durán, 1998). Dado que los fitosanitarios (o sus residuos) se adsorben a la materia orgánica, es en dicha porción del compartimento donde se espera encontrarlos. Por lo tanto, en cada sitio de muestreo se colectó una muestra integrada de los primeros 20cm de suelo. Estas muestras fueron tomadas con una pala y un balde y envueltas en papel de aluminio de forma individual, etiquetadas, embolsadas y conservadas en frío hasta su ingreso al laboratorio para su análisis. La temperatura al momento del análisis para las muestras correspondientes a diciembre de 2014 no se indica en el informe del laboratorio, la correspondiente a las muestras de marzo de 2015 fue de 5°C.

Las muestras de suelo fueron derivadas al Departamento Laboratorio Ambiental de DINAMA, donde para cada una se realizaron dos análisis: uno que cuantifica Glifosato y AMPA (derivatización con FMOC-Cl y detección por HPLC FLD) y otro, multi-residuos, donde fueron incluidos todos los compuestos que pueden detectarse (según las capacidades del laboratorio) en un mismo análisis de cromatografía gaseosa (ver lista completa de productos en Anexo IV).

En los mismos sistemas y fechas en los que se tomaron las muestras de suelo, se llevaron a cabo los muestreos de anfibios.

Muestreo de larvas de anuros

En cada charco se establecieron 2 transectas correspondientes a sus diámetros mayor y menor (aproximando a una elipse su forma). Sobre la transecta de mayor longitud se determinó la posición de 5 estaciones de muestreo equidistantes entre sí. Para evitar el solapamiento de muestras, se tomó como distancia mínima entre estaciones 2m. En cada estación se tomaron muestras, utilizando calderines, mediante pasadas estandarizadas (tres pasadas de ancho de hombro) (Heyer et al., 1994).

Luego de la colecta los individuos fueron sometidos a una sobredosis de anestésico (Benzocaína) hasta su muerte (AVMA, 2007). Posteriormente los ejemplares se fijaron en formol al 4% y fueron llevados al Museo Nacional de Historia Natural (MNHN) para su clasificación taxonómica (Savage y Cei, 1965; Echeverría et al., 1987; Langone, 1989; de Sá y Lavilla, 1997; Langone y de Sá, 2005; Alcalde et al., 2006; de Cerqueira y Nomura, 2006; Borteiro y Kolec, 2007; Kolenc et al., 2008; Laufer y Barreneche, 2008). En el laboratorio se determinó su estadio de desarrollo (siguiendo el criterio de Gosner (1960)) y se tomaron fotografías de cada larva, de donde se obtuvieron las medidas de largo total (de la punta del hocico a la punta de la cola), largo del cuerpo (largo hocico-cloaca) y altura del músculo de la cola en la región final del cuerpo (Fig. 3) (Relyea, 2000; Cortés-Gómez et al., 2015), empleando el software tpsDig2 (Rohlf, 2015).

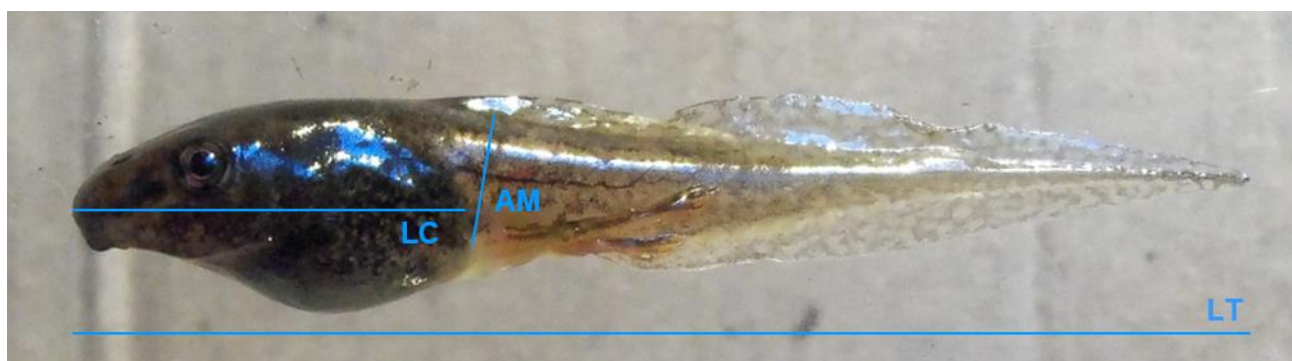


Figura 3. Fotografía de larva de *Hypsiboas pulchellus* en vista lateral. Se muestra cómo fueron tomadas las medidas de largo total (LT), largo del cuerpo (LC) y altura del músculo de la cola (AM).

Las medidas morfométricas fueron determinadas en las larvas que cumplieran con la condición de encontrarse en un estadio de desarrollo menor o igual al 40, debido que a partir de dicho estadio las larvas comienzan a sufrir cambios morfológicos más dramáticos, que podrían interferir en los resultados (Gosner, 1960). Para medir las variables morfométricas correspondientes a los individuos del CH7, se realizó un re-muestreo al azar de 30 individuos (excluyendo a aquellos cuyo estadio de desarrollo fuera mayor al 40) al interior de la muestra, debido a que la misma fue muy abundante (99 individuos). La matriz empleada para la generación de los modelos fue de 70 individuos. Finalmente, los individuos fueron depositados en la colección del MNHN.

Muestreo dirigido a adultos

Se llevó a cabo durante las primeras horas de la noche. Se emplearon 5 minutos por charco, recorriendo con linternas su perímetro y anotando las especies que se avistaban durante ese período de tiempo (Achaval y Olmos, 2007; Ziegler y Maneyro, 2008). Al terminar el tiempo se tomó nota de las especies que estaban vocalizando (AmphibiaWeb, 2017) durante el tiempo del muestreo visual.

En cada cuerpo de agua se tomaron además datos para su caracterización: área, perímetro, categoría de profundidad (determinada en la parte más profunda de la transecta; 1: nivel de agua por debajo de 0.50 m; 2: nivel entre 0.50 y 1.00 m; 3: nivel entre 1.00 y 1.50 m; 4: nivel por encima de 1.50 m), cobertura vegetal (en porcentaje según estimación visual) y uso del suelo en el que estaba inmerso (uso que circunda al cuerpo de agua).

Etapas 4: Validación y análisis de resultados

Dado que SWAT calcula la concentración de fitosanitarios retenido en suelo para la totalidad de la cuenca, como se mencionó anteriormente se corrieron por separado simulaciones para cada una de las subcuencas para las que se contaba con datos de concentración en sedimentos obtenidos a partir de los muestreos de campo. En estas corridas se consideró a cada subcuenca como cuencas individuales, obteniendo así un valor estimado de concentración de fitosanitarios retenido en suelo para cada una. Los valores de fitosanitarios exportados (disueltos y adsorbidos) se obtienen como resultado para cada HRU, con frecuencia mensual y como promedio anual.

Para cada subcuenca con datos medidos se realizó una serie de cuatro corridas de un ciclo de cultivo de verano (2010-2011, 2011-2012, 2012-2013 y 2013-2014), comenzando en setiembre de un año y terminando en abril del siguiente. Esto tuvo como objetivo comprender mejor la forma de modelar de SWAT y contar con datos de cuatro ciclos diferentes para poder promediar los valores arrojados por el modelo, ya que el período de modelación no coincide con el período de muestreo (en ninguno de los cuatro casos). Los datos de tipos y usos de suelo así como el DEM permanecieron constantes, por lo tanto el único dato de entrada que cambió entre corridas fue el clima.

Las concentraciones de fitosanitarios producto del análisis de las muestras obtenidas en campo, fueron contrastadas con las concentraciones estimadas por los modelos generados para las subcuencas correspondientes con los puntos de muestreo. Para ello se realizaron correlaciones de Spearman y regresiones lineales para cada uno de los fitosanitarios incluidos en la modelación, contrastando el dato concreto medido (correspondiente a marzo, por considerar que es el que refleja el acumulado en todo el ciclo del cultivo) con el promedio de los valores previstos por el modelo en las cuatro simulaciones realizadas, para cada subcuenca con dato medido. De acuerdo con Piñeiro y colaboradores (2008), la regresión se realizó como observado (en eje y) versus predicho (en eje x), ya que según estos autores al evaluar modelos la regresión predicho (en eje y) versus observado (en eje x) puede llevar a estimaciones erróneas de pendiente e intercepto.

Por otro lado, se comparó la riqueza y abundancia de anfibios, tanto de especies (adultos y larvas juntos) como de adultos y larvas por separado, entre sistemas mediante métodos de clasificación multivariados (Cluster Analysis, ACP y NMDS), realizando un análisis de tipo Q (entre sitios) y empleando índices de asociación apropiados, según se tratara de datos cuantitativos o de presencia-ausencia. Para el análisis de presencia-ausencia del total de especies el índice empleado fue el de Jaccard, que da más peso a las presencias por sobre las ausencias, mientras que para el análisis de presencia-ausencia de adultos se empleó el índice de Ochiai, que no es sensible al número de datos (N) ni a la cantidad de variables (Hubálek, 1982). Por último, para el análisis correspondiente al conteo de larvas se debió aplicar la transformación logarítmica, debido al alto número de ceros de la matriz, y el índice empleado fue el de Bray-Curtis (Anderson, 2001).

El programa empleado, tanto para los análisis de riqueza y abundancia de anfibios como para la realización de las correlaciones y regresiones entre las concentraciones medidas y simuladas de fitosanitarios, fue el Past® (Hammer et al., 2001).

Análisis morfométrico

Está ampliamente documentado que las larvas de anfibios poseen plasticidad fenotípica (Miner et al., 2005), esto es la capacidad de que un mismo genotipo produzca diferentes fenotipos en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Begon et al., 2006; Whitman y Agrawal, 2009). Existen estudios que evidencian este fenómeno en respuesta a la presencia de productos fitosanitarios en el ambiente (Relyea et al., 2005; Relyea, 2012). El estudio de la plasticidad fenotípica en la etapa larval es particularmente importante porque no solo lleva al individuo a adecuarse al ambiente acuático sino que además lo condiciona en su fase terrestre (Bridges, 2002; Relyea y Hoverman, 2003). Es decir, el fenotipo inducido llevará a cambios en, por ejemplo, la probabilidad de supervivencia del individuo como juvenil. La forma más común de representar la plasticidad fenotípica es a través de una “norma de reacción”, esto es, a través de una función genotipo-específica que relaciona el valor de un rasgo fenotípico con el ambiente en el cual dicho valor se observa (Naya, 2010). Existen numerosos estudios que dan cuenta de la plasticidad fenotípica en larvas de anfibios, evidenciada a través de medidas morfométricas, como la relación largo total- largo del cuerpo y medidas que tienen que ver con el desarrollo de la musculatura de la cola (e.g. Relyea y Hoverman, 2003; Relyea, 2004b; Miner et al., 2005; Buskirk, 2009; Perazza, 2013; Carabio et al., 2017).

En este estudio, se compararon características morfológicas de las larvas de anuros en función de las condiciones ambientales del sistema en que estaban inmersas. Para ello se tomaron como variables de respuesta una aproximación a la forma corporal (largo de cuerpo/largo total) y la altura del músculo de la cola, generando modelos lineales mixtos, donde el uso del suelo y las concentraciones de los diferentes compuestos se incluyeron como efectos fijos, y el estadio de desarrollo como efecto aleatorio. Esto último se debe a que conforme avanza el desarrollo de los individuos sus características morfométricas cambian en función de ello. Si no se filtrara este efecto colocándolo como efecto aleatorio podríamos concluir que existen efectos de determinada condición ambiental sobre la altura del músculo de la cola cuando en realidad lo que se está observando es un efecto del desarrollo ontológico normal de la especie. La variable ‘forma’ se trabajó en transformación

logarítmica, ya que no presentaba distribución normal. Para cada compuesto detectado en al menos una muestra de suelo obtenidas en la campaña de diciembre, se realizaron diversos modelos: incluyendo solo usos como variable explicativa, incluyendo solo al compuesto como variable explicativa, incluyendo al compuesto + usos del suelo e incluyendo al compuesto * usos del suelo (considerando no solo los efectos individuales del compuesto y el uso sobre la variable de respuesta sino también el efecto combinado de ambos). Por último, también para cada compuesto se generó un modelo sin efectos aleatorios, a fin de comprobar qué modelo presentaba el mejor ajuste. Todos los modelos fueron comparados por el criterio de información de Akaike (AIC). El software empleado para estos análisis fue el R® (R Development Core Team, 2008).

Para la generación de los modelos en R®, independientemente de la variable de respuesta a evaluar, se consideraron únicamente las larvas de *H. pulchellus* colectadas en el muestreo de diciembre de 2014. La elección de la especie se debió a que fue la única presente en todos los charcos en dónde se colectaron larvas y, a su vez, para evitar incluir una nueva variable aleatoria en los modelos (i.e. la especie tiene un efecto sobre la altura del músculo o sobre la forma, por lo cual debería considerarse como variable aleatoria en los modelos a fin de independizar el análisis de su efecto). Por otro lado, se consideró únicamente el muestreo de diciembre de 2014 debido a que no se obtuvo un número de larvas representativo de todos los usos del suelo en el muestreo de marzo de 2015. De todos los compuestos detectados Clorpirifos fue el único que no se consideró en este análisis, debido a que no fue detectado en muestras de diciembre.

Los modelos con todos los fitosanitarios y usos como variables explicativas no pudieron realizarse, dado el bajo número de muestras con que se contaba (i.e. estadísticamente no se pueden estimar todos los parámetros necesarios).

Análisis de especies indicadoras

Se utilizó el método INDVAL desarrollado por Dufrene y Legendre (1997) (en Legendre y Legendre, 1998) en busca de determinar si existen en la cuenca especies indicadoras de ciertas condiciones ambientales. Dicho método determina un valor indicador para cada especie y la probabilidad de que sea indicadora de la condición que se está probando, basado en la especificidad (exclusividad en un hábitat) y en la fidelidad (frecuencia de ocurrencia en el hábitat).

Las condiciones ambientales que fueron incluidas como determinantes (medidas en campo) fueron: la presencia de fitosanitarios empleados en la actualidad (cada uno por separado), la presencia de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) y el uso del suelo. En el caso de usos del suelo, el vector correspondiente a la condición ambiental se generó asignando un número para cada uso. En cuanto a COPs se otorgó un número del cero al cinco según la cantidad de COPs que se encontró en cada punto de muestreo. Finalmente, para cada uno de los fitosanitarios hallados empleados en la actualidad, se dividió en cuartiles los valores correspondientes a su concentración y se adjudicaron las categorías según: 1 si estaba por debajo del primer cuartil, 2 si estaba entre el primer y el segundo cuartil, 3 si estaba entre el segundo y el tercer cuartil y 4 si se encontraba por encima del tercer cuartil. Se consideraron como especies indicadoras aquellas que presentaron un valor indicador mayor de 70 y un p-valor menor de 0.05. El análisis fue realizado en el software R® y el paquete estadístico empleado fue indicspecies (INDVAL con modificaciones de De Cáceres, 2010).

Resultados

Etapas 1: Generación de Insumos para el Modelo

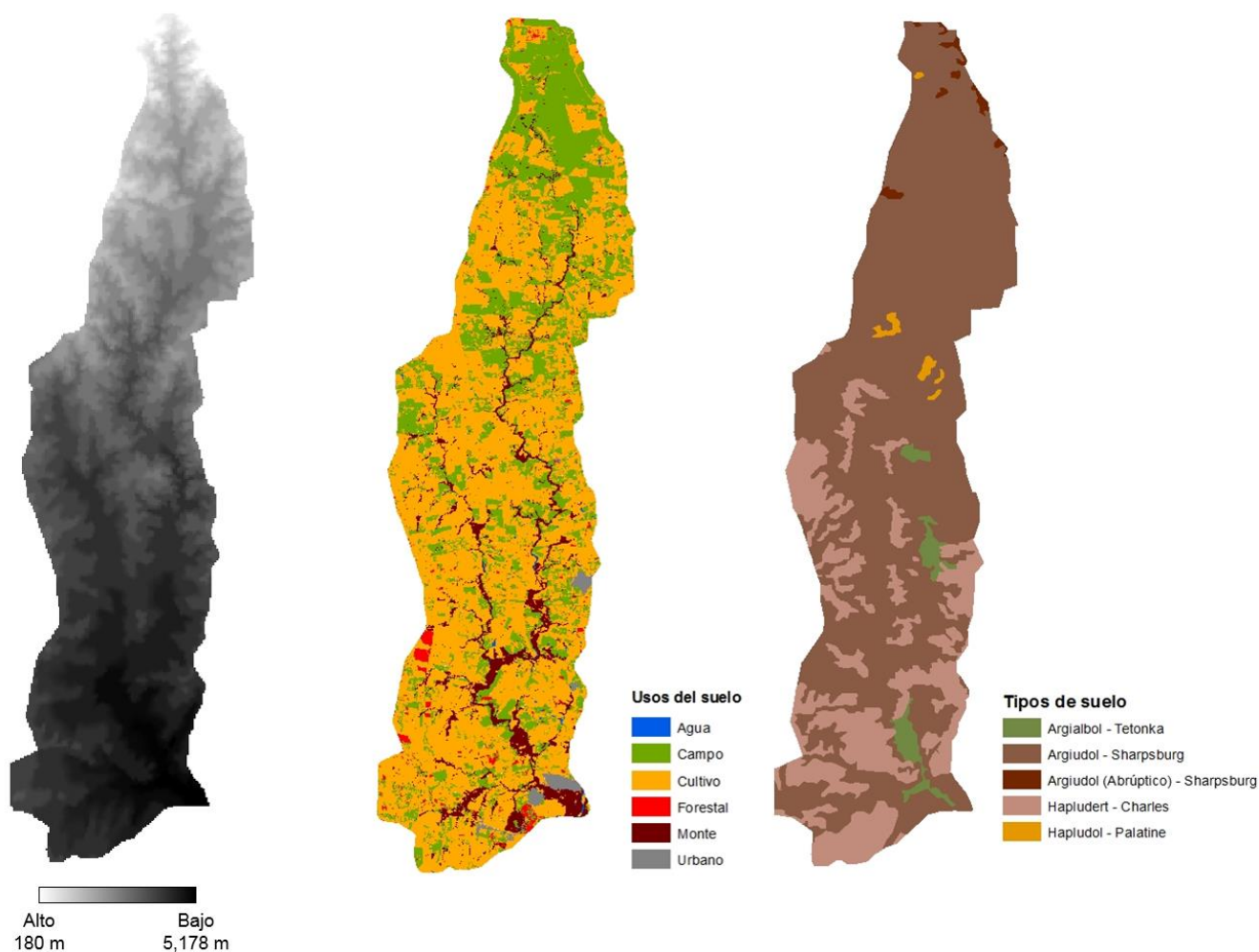


Figura 4. Modelo digital de elevación (DEM), usos y tipos de suelo en la cuenca del Arroyo de La Virgen. DEM: realizado a partir de las cartas topográficas Servicio Geográfico Militar, resolución de 90 m. Usos: según clasificación supervisada realizada a partir de imagen satelital de marzo de 2014. Tipos de suelo: según equivalencia suelos CONEAT a suelos USDA y estos últimos a grupos de suelos (SWAT).

En esta primera etapa se generaron el Modelo Digital de Elevación, la clasificación supervisada de usos del suelo de la cuenca, y la capa de tipos de suelo en ella (resultado de la equivalencia entre los suelos de Uruguay y los grupos de suelo considerados por el SWAT) (Fig. 4). En esta etapa además se realizaron las entrevistas al Ing. Agr. Msc. Julio Rodríguez Lagreca y al Ing. Agr. Dr. Enrique Castiglioni, que permitieron definir qué

productos fitosanitarios modelar y qué manejo indicar para el uso del suelo 'cultivo' (ver Tabla 1 en Métodos).

Etapas 2: Modelación

A partir del modelo digital de terreno de la cuenca y la información de usos y tipos de suelo en ella, el modelo generó 27 subcuencas y 178 HRUs (Fig. 5), de las cuales 70 tienen como uso del suelo 'Cultivo' (unas 26033 ha).

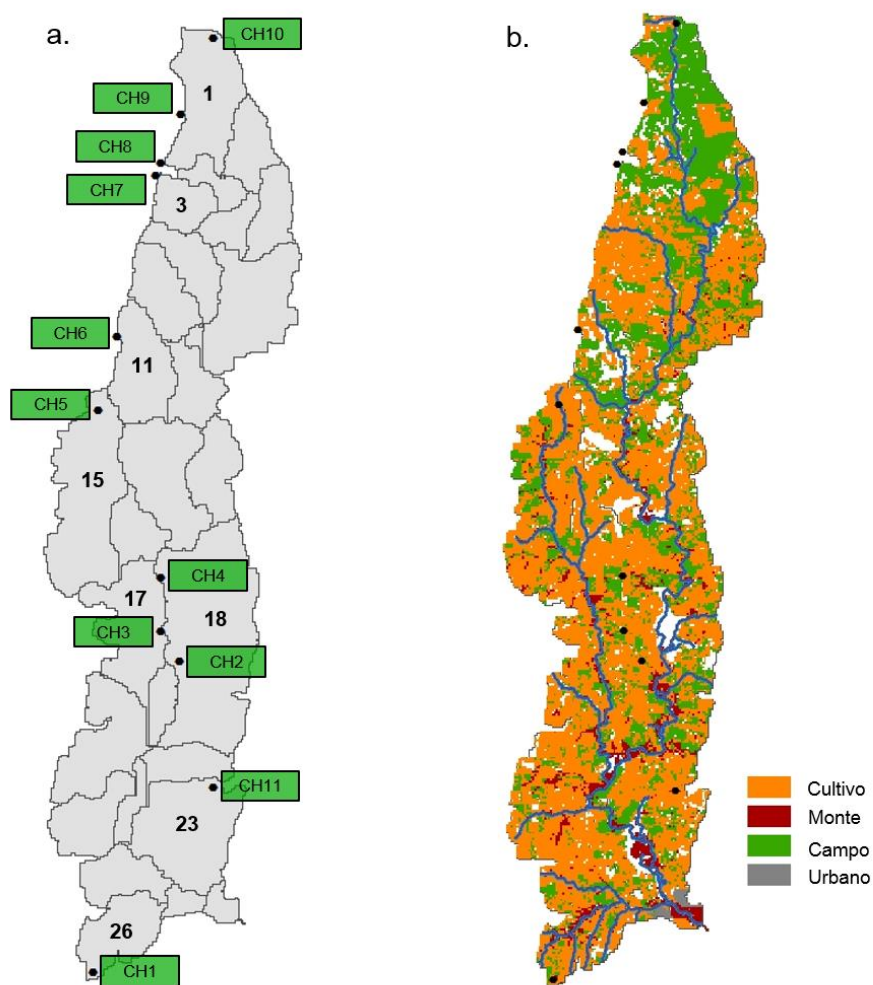


Figura 5. Subcuencas, HRUs y sitios de muestreo. a. subcuencas para las que se obtuvieron datos de concentración de fitosanitarios en suelo y ubicación de los puntos de muestreo; b. HRUs según uso del suelo (no se diferencian las HRUs individuales).

Los valores tanto de Glifosato como de Clorpirifos retenidos en suelo (Tabla 2) corresponden al primer año de corrida (i.e. medio ciclo de cultivo), para todos los casos, y se estimó un valor para cada subcuenca. Al momento de comparar las concentraciones medidas en los

puntos de muestreo con las simuladas con SWAT, el valor simulado que se asignó a cada punto de muestreo se corresponde con el valor promedio estimado para la subcuenca en que este punto estaba localizado, independientemente del uso del suelo dominante en el entorno del punto de muestreo.

De las serie de corridas realizadas tanto para Glifosato como para Clorpirifos (Tabla 2), se desprende que la concentración final de Glifosato varía considerablemente y esta variación está asociada a variaciones en las condiciones climáticas, no así la de Clorpirifos. Esta observación surge a partir de que entre un año y otro lo único que varía en la modelación es el clima. En el año correspondiente a la simulación 3 (2012-2013), donde se estimaron valores retenidos de Glifosato sensiblemente menores que en las restantes tres simulaciones, la precipitación durante el ciclo de cultivo (01/10 al 20/04) fue la mayor de los cuatro años (2010-2011: 373,797mm; 2011-2012: 402,741mm; 2012-2013: 752,447mm; 2013-2014: 644,956mm). Además en el período 2012-2013 se registraron precipitaciones importantes tanto en los días posteriores al día indicado en el modelo como primera aplicación de Glifosato, así como en los días posteriores a la primera aplicación de Clorpirifos indicada (Tabla 3).

Tabla 2. Concentraciones de fitosanitarios retenidas en suelo (Kg/há) estimadas por SWAT para cada subcuenca de las que se tiene dato medido, según periodos de tiempo modelados. En todos los casos las corridas fueron desde el 1° de setiembre de un año al 30 de abril del siguiente. Los valores arrojados por el modelo corresponden a lo retenido por año, tomando siempre el primer año de lo modelado.

Sub-cuenca	Glifosato (kg/há)				Clorpirifos (kg/há)			
	2010-2011	2011-2012	2012-2013	2013-2014	2010-2011	2011-2012	2012-2013	2013-2014
1	0,0062	0,0060	0,0024	0,0052	0,0019	0,0018	0,0017	0,0016
3	0,0184	0,0179	0,0088	0,0162	0,0054	0,0053	0,0049	0,0048
11	0,0233	0,0224	0,0094	0,0201	0,0070	0,0068	0,0063	0,0061
15	0,0370	0,0357	0,0193	0,0327	0,0110	0,0107	0,0097	0,0096
17	0,0381	0,0371	0,0270	0,0355	0,0111	0,0108	0,0100	0,0099
18	0,0355	0,0334	0,0166	0,0303	0,0102	0,0100	0,0093	0,0090
23	0,0297	0,0288	0,0180	0,0270	0,0087	0,0085	0,0078	0,0077
26	0,0315	0,0306	0,0216	0,0291	0,0092	0,0090	0,0081	0,0080

Tabla 3. Precipitaciones (pp) en los 7 días sucesivos a la aplicación de fitosanitarios, según datos empleados para la modelación. Fuente: simulador CMIP3.

	2010 pp (mm)	2011 pp (mm)	2012 pp (mm)	2013 pp (mm)		2011 pp (mm)	2012 pp (mm)	2013 pp (mm)	2014 pp (mm)
	1° Aplicación de Glifosato					2° Aplicación de Glifosato			
1	0,000	0,000	5,514	0,163		0,477	0,000	0,000	19,415
2	0,000	0,026	2,214	0,477		0,010	0,000	0,000	0,604
3	0,000	0,017	0,158	3,753		7,752	0,000	0,098	0,000
4	0,000	0,010	0,220	0,098		3,320	0,000	71,725	0,000
5	0,000	2,204	60,277	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000
6	14,622	76,533	14,881	0,000		0,000	0,000	0,000	6,314
7	0,529	1,236	79,788	0,000		3,457	0,000	0,000	0,180
	1° Aplicación de Clorpirifos					2° Aplicación de Clorpirifos			
1	0,000	8,315	1,892	0,134		0,000	5,569	6,211	0,014
2	0,000	2,692	15,117	0,179		0,002	1,554	0,000	15,230
3	18,632	0,000	1,566	0,002		0,000	0,007	0,000	0,649
4	1,833	0,000	1,246	0,000		0,000	8,744	0,000	0,402
5	0,223	0,000	37,700	0,000		0,000	0,000	0,000	8,058
6	0,000	0,046	0,000	0,000		7,958	0,000	0,000	13,688
7	0,000	0,003	0,000	0,000		17,645	5,593	0,000	0,003

La concentración de cada producto que es exportada hacia el canal principal, se obtiene en SWAT para cada HRU (Fig. 6) de forma disuelta y adsorbida. Existen zonas de la cuenca que exportan fitosanitarios en mayores cantidades que otras. Según el análisis de puntos calientes (Fig. 7), existen dos regiones en la porción media de la cuenca que podrían representar un peligro potencial debido a la alta cantidad de fitosanitarios que exportan. En contraste en la región baja de la cuenca existen zonas donde la exportación hacia el canal es mínima, por lo cual, podrían estar actuando como sumideros de los compuestos, principalmente en el caso de Clorpirifos. Las zonas en rojo y anaranjado corresponden a las regiones de la cuenca donde se estaría exportando mayor cantidad de fitosanitarios hacia el arroyo (puntos calientes) y las zonas en azul a zonas donde se estarían reteniendo grandes cantidades de compuestos (zonas frías).

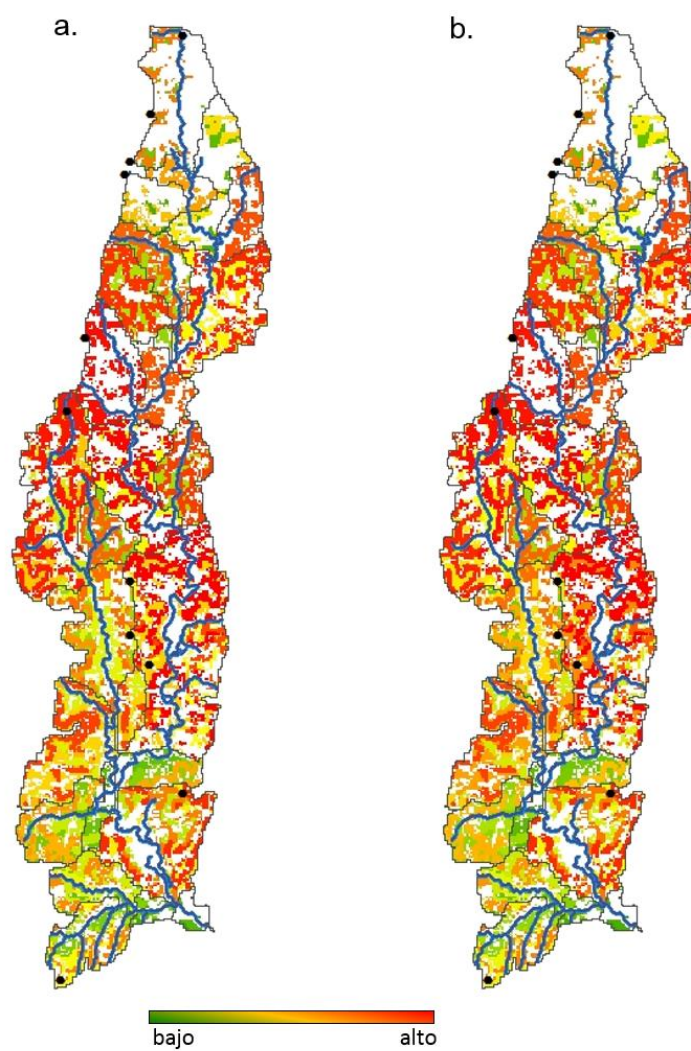


Figura 6. Mapas de valores exportados totales (disuelto + adsorbido), según corrida 01/09/2013-30/04/2014. a. Glifosato; b. Clorpirifos.

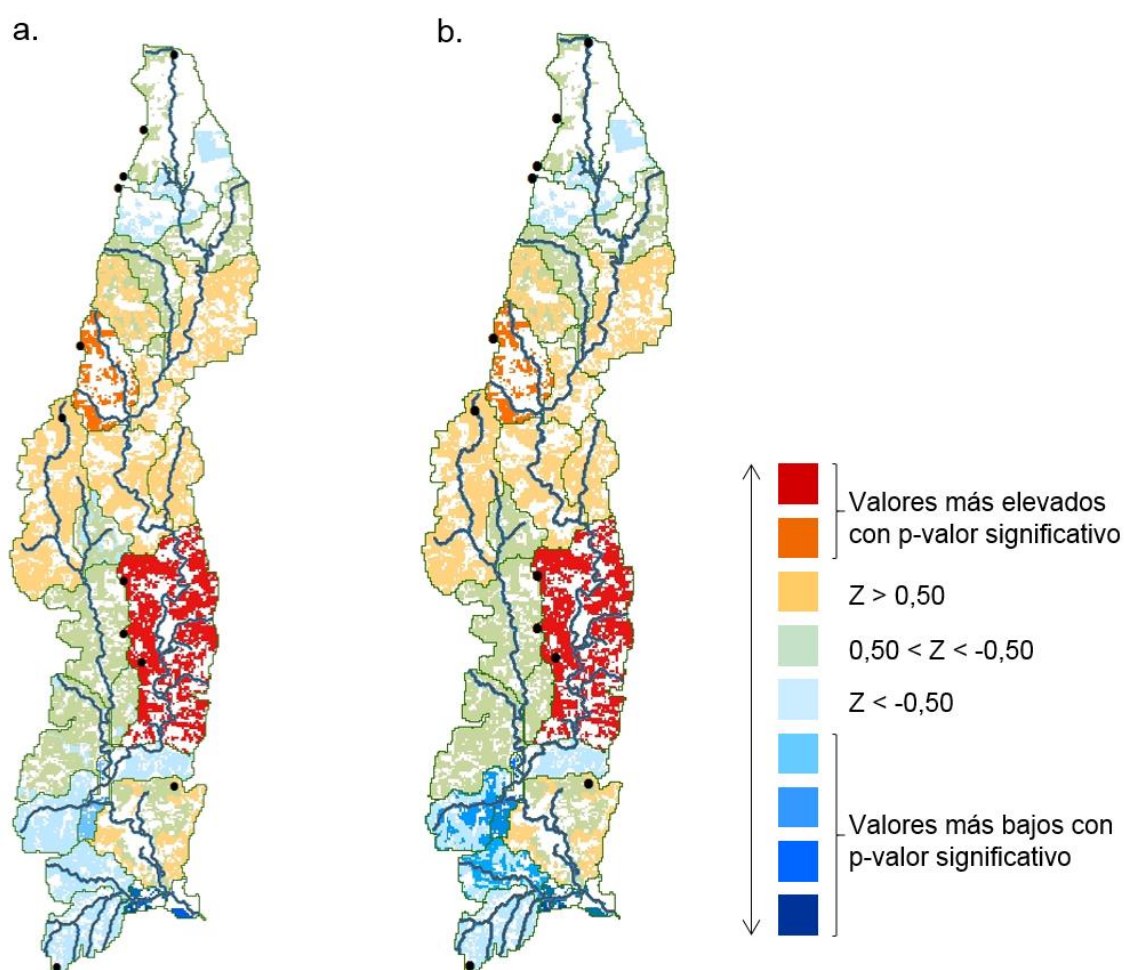


Figura 7. Mapa de exportación/retención obtenido a partir de análisis de puntos calientes realizados con los resultados del SWAT (correspondientes a la simulación 01/09/2013-30/04/2014) para los datos de fitosanitarios exportados (adsorbido + disuelto). a. Glifosato total; b. Clorpirifos total. Se consideran significativos aquellos valores de p menores a 0,10.

Etapas 3: Campañas de campo

Las concentraciones halladas para cada punto de muestreo, por estación, de todos los compuestos que fueron detectados al menos en una muestra se presentan en la Tabla 4. Algunos de los compuestos detectados en la cuenca son de uso prohibido en nuestro país. Tal es el caso de Clordano, Hexaclorobenceno, Mirex y DDT, prohibidos en Uruguay desde 2005, y de Endosulfán prohibido desde 2011. Los mencionados cinco compuestos están incluidos en el convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (Stockholm Convention).

Tabla 4. Concentraciones de fitosanitarios, determinadas a partir de los análisis de sedimento, para diciembre de 2014 (D) y marzo de 2015 (M). Ciper.: Cipermetrina; Clor.: Clordanocis; End_al: Endosulfán alfa; End_su: Endosulfán sulfato; Hexa.: Hexaclorobenceno; Clorpi.: Clorpirifos. o,p DDE y p,p' DDE son metabolitos de DDT.

	AMPA (mg/kg)		Ciper. (µg/kg)		Clor. (µg/kg)		End_al (µg/kg)		End_su (µg/kg)		Glifosato (mg/kg)		Hexa. (µg/kg)		Mirex (µg/kg)		o,p DDE (µg/kg)		p,p' DDE (µg/kg)		Clorpi. (µg/kg)	
	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M
CH1	0,32	0,69	*	*	*	*	*	*	1,90	0,78	0,06	0,10	0,10	*	0,50	0,10	0,10	*	0,50	0,17	*	1,25
CH2	**	**	40	*	*	*	*	*	*	*	**	0,06	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,56
CH3	0,28	0,56	*	*	*	*	*	*	*	*	0,21	0,16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,23
CH4	0,25	0,30	29	*	*	*	*	*	*	*	0,06	0,25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,47
CH5	0,19	0,13	*	*	*	*	*	*	*	*	0,06	0,16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,16
CH6	0,07	**	*	*	*	*	*	*	*	*	**	0,13	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,99
CH7	0,02	**	*	-	*	-	0,10	-	*	-	**	**	*	-	*	-	*	-	*	-	*	-
CH8	1,01	0,06	*	*	0,10	*	*	*	*	*	0,81	**	*	*	0,10	*	*	*	0,20	*	*	0,13
CH9	**	**	*	*	0,10	*	*	*	*	*	**	0,05	*	*	*	*	*	*	0,20	*	*	0,35
CH10	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	**	0,09	*	*	*	*	*	*	0,10	*	*	*
CH11	-	0,11	-	*	-	*	-	*	-	*	-	0,11	-	*	-	*	-	*	-	*	-	1,52

*por debajo del límite de detección (LD)

**por debajo del límite de cuantificación (LC)

CH11 se muestreó únicamente en marzo de 2015

CH7 marzo de 2015: el laboratorio perdió las muestras

Las características de cada uno de los charcos muestreados pueden verse en la Tabla 5 (imágenes en Anexo V). Estos presentaron una cobertura vegetal variable (de 0% a 100%), que en general fue menor en pradera artificial. Las profundidades en general estuvieron entre 0.5 y 1.50 m y el área promedio (exceptuando al CH10 que no puede considerarse como un charco estándar ya que corresponde a las nacientes del arroyo, dónde se muestrearon pozones de agua entre las rocas) fue de 1292.05 m². Dejando por fuera al CH7 (98.54 m²) y al CH5 (474.04 m²) todos los puntos de muestreo superaron los 1000 m², siendo el de mayor tamaño el CH1 (2316.77 m²).

Tabla 5. Características de los charcos muestreados. Profundidad según categorización: 1: nivel de agua por debajo de 0.50 m; 2: nivel entre 0.50 y 1.00 m; 3: nivel entre 1.00 y 1.50 m; 4: nivel por encima de 1.50 m. Cobertura vegetal según estimación visual.

	Perímetro (m)	Área (m ²)	Profundidad	Cobertura vegetal (%)	Uso del suelo
CH1	254,75	2316,77	2	80	Soja
CH2	166,78	1709,65	3	10	Pradera
CH3	167,02	1817,02	3	35	Maíz
CH4	145,16	1296,12	3	<5	Pradera
CH5	92,97	474,04	2	25	Pradera
CH6	158,30	1477,73	1	0	Pradera
CH7	42,21	98,54	2	100	Campo mejorado
CH8	141,17	1001,60	4	10	Maíz
CH9	162,61	1475,78	1	40	Campo natural
CH10*	12,19	7,66	-	-	Campo natural
CH11	135,90	1253,25	3	0	Pradera

*No se indican categoría de profundidad ni cobertura vegetal debido a que este punto de muestreo corresponde a las nacientes del Arroyo de La Virgen (porción superior de la cuenca), donde no fue muestreado un “charco” estándar, sino pozones de agua entre las rocas.

En cuanto a anfibios (Tabla 6), se registró un total de nueve especies correspondientes a cuatro familias (Hylidae, Leptodactylidae, Leiuperidae y Bufonidae). Integrando los registros de adultos y larvas, las especies más comunes en la cuenca fueron: *H. pulchellus* (11/11), *P. minutus* (9/11) y *L. latrans* (9/11). *P. falcipes* y *R. arenarum* solo se registraron en una oportunidad (un solo punto, en una sola estación). *P. gracilis* se registró únicamente en diciembre de 2014. En cuanto a larvas, se registraron únicamente de *H. pulchellus* (9/11), *P. minutus* (5/11), *P. gracilis* (3/11) y *L. latrans* (1/11). En los puntos CH6 y CH11 (rodeados de praderas y en las zonas media y baja de la cuenca) únicamente se registraron adultos. El muestreo que registró mayor riqueza y abundancia de larvas en general fue el realizado en diciembre de 2014. El CH7 (rodeado de campo natural mejorado y en la zona alta de la cuenca) presentó el mayor número de larvas (244) mientras que el CH8 (inmerso en cultivo de maíz y en la zona alta de la cuenca) fue en el que se registró mayor número de especies en estadio larval (4). En los puntos CH2, CH4 y CH9 (rodeados de pradera los dos primeros y campo natural el último y en la región baja, media y alta de la cuenca, respectivamente) se registró una única larva, en todos los casos correspondiente a la especie *H. pulchellus*, en

diciembre (Tabla 7). El número de larvas observado fue variable espacial y temporalmente y los estadios de desarrollo presentaron un rango amplio para todas las especies (25 a 41, 42 o 43) a excepción de *L. latrans* que tuvo rangos de estadio más bajos (25 y 26 en diciembre y 34 en marzo). El muestreo correspondiente al mes de marzo de 2015 (verano) se realizó durante un período de sequía.

Tabla 6. Presencia-Ausencia de especies, por charco y por temporada. Hp: *Hypsiboas pulchellus*; Pm: *Pseudis minuta*; Sg: *Scinax granulatus*; Llati: *Leptodactylus latinasus*; Llatr: *Leptodactylus latrans*; Lg: *Leptodactylus gracilis*; Pg: *Physalaemus gracilis*; Pf: *Pseudopaludicola falcipes*; Ra: *Rhinella arenarum*; L: larvas; A: adultos (observados y/o vocalizando). S: riqueza total de especies.

Familia		Hylidae			Leptodactylidae			Leiuperidae		Bufonidae	S
Especie		Hp	Pm	Sg	Llati	Llatr	Lg	Pg	Pf	Ra	
CH1	Diciembre 2014	LA	-	-	-	A	-	-	-	-	2
	Marzo 2015	-	LA	-	-	-	-	-	-	-	1
CH2	Diciembre 2014	LA	-	-	A	A	-	-	-	-	3
	Marzo 2015	-	-	-	-	A	-	-	-	-	1
CH3	Diciembre 2014	LA	A	A	A	-	-	A	-	-	5
	Marzo 2015	L	-	-	A	-	-	-	-	-	2
CH4	Diciembre 2014	LA	A	-	A	A	-	A	-	-	5
	Marzo 2015	-	A	-	-	A	-	-	-	-	2
CH5	Diciembre 2014	LA	LA	A	-	A	-	LA	-	-	5
	Marzo 2015	-	A	-	-	A	-	-	-	-	2
CH6	Diciembre 2014	A	A	-	A	A	-	-	-	-	4
	Marzo 2015	-	A	-	A	A	-	-	-	-	3
CH7	Diciembre 2014	LA	LA	A	-	A	-	LA	-	-	5
	Marzo 2015	L	LA	A	-	A	-	-	-	A	5
CH8	Diciembre 2014	LA	A	A	A	LA	A	LA	A	-	8
	Marzo 2015	LA	LA	-	-	LA	-	-	-	-	3
CH9	Diciembre 2014	LA	A	A	A	A	A	-	-	-	6
	Marzo 2015	-	-	-	-	A	-	-	-	-	1
CH10	Diciembre 2014	LA	LA	A	A	-	A	A	-	-	6
	Marzo 2015	A	L	-	-	-	-	-	-	-	2
CH11*	Diciembre 2014	A	-	-	A	A	-	-	-	-	3

*No se cuenta con datos del CH11 en primavera.

Tabla 7. Larvas muestreadas, por charco, por campaña de campo. n: número de larvas colectadas; estadio: rango de estadios de desarrollo al interior de la muestra según Gosner (1960).

		<i>H. pulchellus</i>		<i>P. minutus</i>		<i>L. latrans</i>		<i>P. gracilis</i>	
	Muestreo	n	estadio	n	estadio	n	estadio	n	estadio
CH1	Diciembre 2014	9	25-42	0	-	0	-	0	-
	Marzo 2015	0	-	3	38-42	0	-	0	-
CH2	Diciembre 2014	1	25	0	-	0	-	0	-
	Marzo 2015	0	-	0	-	0	-	0	-
CH3	Diciembre 2014	2	25-42	0	-	0	-	0	-
	Marzo 2015	4	32-35	0	-	0	-	0	-
CH4	Diciembre 2014	1	25	0	-	0	-	0	-
	Marzo 2015	0	-	0	-	0	-	0	-
CH5	Diciembre 2014	15	39-43	5	26-30	0	-	7	30-41
	Marzo 2015	0	-	0	-	0	-	0	-
CH6	Diciembre 2014	0	-	0	-	0	-	0	-
	Marzo 2015	0	-	0	-	0	-	0	-
CH7	Diciembre 2014	99	26-44	39	25-42	0	-	78	25-41
	Marzo 2015	19	35-44	9	31-41	0	-	0	-
CH8	Diciembre 2014	21	25-40	0	-	5	25-26	15	25-41
	Marzo 2015	16	25-41	10	25-43	1	34	0	-
CH9	Diciembre 2014	1	29	0	-	0	-	0	-
	Marzo 2015	0	-	0	-	0	-	0	-
CH10	Diciembre 2014	1	35	2	37-40	0	-	0	-
	Marzo 2015	0	-	1	31	0	-	0	-
CH11*	Marzo 2015	0	-	0	-	0	-	0	-

*No se cuenta con datos del CH11 en primavera.

En síntesis, como resultado de las campañas de campo, a partir de las muestras de suelo, se detectaron tres productos fitosanitarios de uso actual (Glifosato/AMPA, Cipermetrina y Clorpirifos) y cinco COPs (Clordano, Endosulfán, Hexaclorobenceno, Mirex y DDT). Mientras que, respecto a anfibios, se registró la presencia de 9 especies en la cuenca, de las cuales únicamente 4 se encontraron tanto en estadio larval como adulto. La mayor diversidad de anfibios se registró en diciembre y tanto la cantidad de larvas como los estadios de desarrollo observados fueron variados entre puntos de muestreo y estaciones del año.

Etapas 4: Validación y análisis de resultados

Los puntos CH2, CH4 y CH6 se encuentran en zonas de la cuenca que resultaron ser puntos calientes (Fig. 7). Nótese que dichos puntos no tienen un patrón aparente en cuanto a la concentración de Glifosato en suelo y en cuanto a la concentración de Clorpirifos los tres presentan valores intermedios (Tabla 4). En los puntos CH1 y CH11, próximos con los puntos

fríos (zonas con valores de z bajos pero no significativos), los valores de Glifosato en suelo son intermedios y los valores de Clorpirifos son los más elevados de la cuenca (Tabla 4).

La comparación de las concentraciones de fitosanitarios en suelo simulados por SWAT y las medidas a campo, pueden verse en la Tabla 8. De acuerdo a las correlaciones realizadas para ambos compuestos (Fig. 8) y la regresión de valores observados de Glifosato en función de valores modelados ($y = 6,51E-06x - 0,033247$, $r^2=0,41302$ y $p=0,032959$), el ajuste del modelo SWAT es bueno para Glifosato pero no para Clorpirifos.

Tabla 8. Valores de Glifosato y Clorpirifos promedio de las cuatro simulaciones realizadas (2010-2011, 2011-2012, 2012-2013 y 2013-2014) y valores medidos, a partir de muestras de sedimento correspondientes a marzo de 2015, por subcuenca.

Sub-cuenca	Glifosato		Clorpirifos	
	SWAT (kg/ha)	marzo 2015 (mg/kg)	SWAT (kg/ha)	marzo 2015 (µg/kg)
1	0,00495	0,00	0,00174	0,13
		0,05		0,35
		0,09		0,00
3	0,01531	0,00	0,00512	*
11	0,01881	0,13	0,00652	0,99
15	0,03118	0,16	0,01024	0,16
17	0,03442	0,16	0,01043	0,23
18	0,02897	0,06	0,00960	0,56
		0,25		0,47
23	0,02587	0,11	0,00815	1,52
26	0,02819	0,10	0,00856	1,25

*No se cuenta con el valor medido de Clorpirifos en marzo para la subcuenca 3, por problemas en el laboratorio.

Los puntos más alejados de la recta en la correlación realizada para Glifosato son: CH7 (campo mejorado) y CH2 (pradera), para los que se obtuvieron concentraciones muy por debajo de las esperadas según la simulación, y CH4 (pradera), para el que se obtuvo una concentración muy por encima de la esperada. En los dos primeros casos la diferencia puede deberse a que el uso del suelo no es cultivo. El punto CH7 se encuentra en una subcuenca que posee en su mayoría predios de 'cultivo', por lo cual el valor retenido en suelo que el modelo arroja está muy influenciado por esta predominancia de uso. Sin embargo, el uso real del punto de muestreo es campo natural, por lo cual no se espera que se esté empleando Glifosato en él, si bien podría haber arrastre desde predios vecinos. En cuanto al punto CH2,

refiere a un punto de pradera artificial que en la modelación fue considerado como 'cultivo', asumiendo el uso de Glifosato cuando en realidad probablemente no se emplee o bien se emplee en concentraciones muy por debajo de las usadas en cultivos de verano.

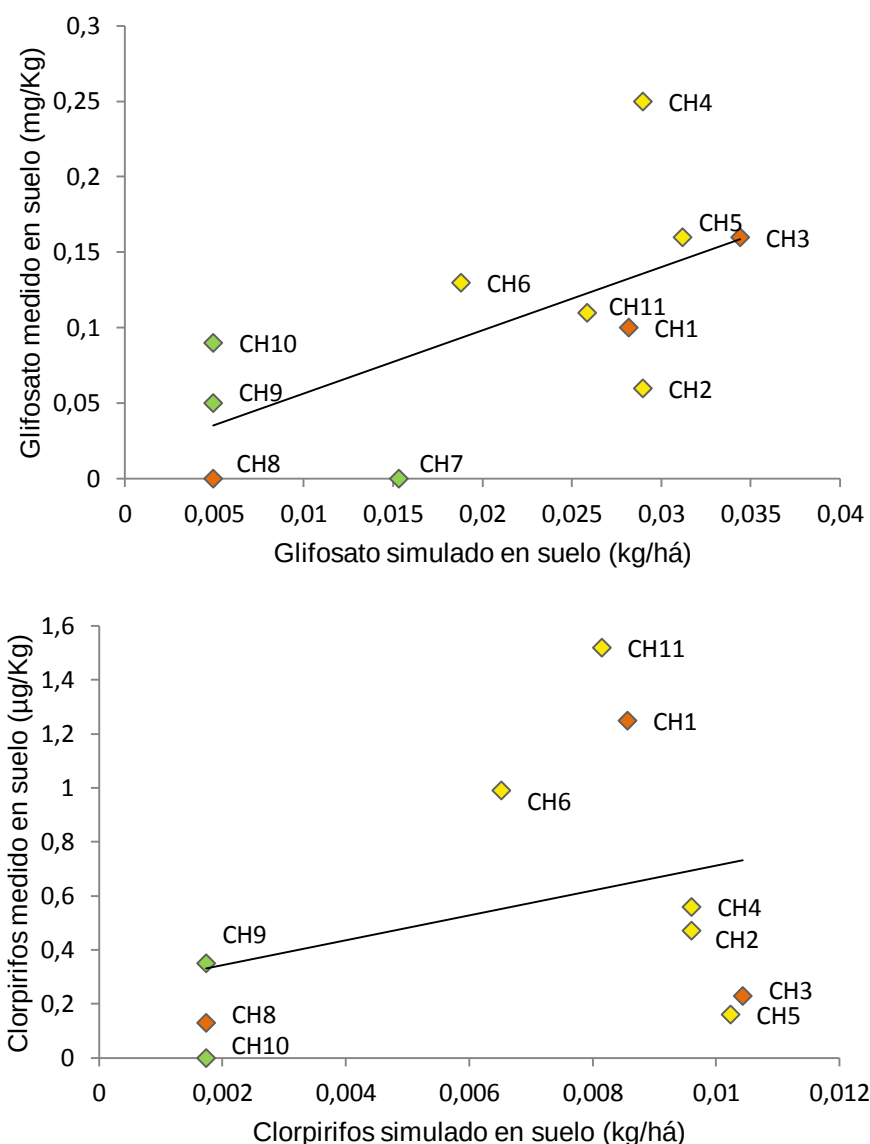


Figura 8.Correlación entre la media de las concentraciones obtenidas con SWAT para las cuatro simulaciones realizadas (2010-2011, 2011-2012, 2012-2013 y 2013-2014) y las concentraciones determinadas en suelo (muestras correspondientes a marzo de 2015). Arriba: Glifosato; Coeficiente de correlación (Spearman) =0.73905; p-valor=0.00936. Abajo: Clorpirifos; Coeficiente de correlación (Spearman) =0.17233; p-valor=0.63403. Anaranjado: 'Cultivo'; Verde: 'Campo natural'; Amarillo: 'Pradera'.

En el caso del CH4, si bien se encuentra en una parte elevada, está en una depresión del terreno y su vegetación periférica es escasa. Por lo tanto, podría funcionar como una trampa de residuos de glifosato por su ubicación puntual en un microrelieve de depresión. Además aguas arriba hay un charco más pequeño, que probablemente enlentece la velocidad del flujo del escurrimiento superficial y aumenta la capacidad de retención en el punto CH4.

Según el análisis de asociación entre sitios en función de la presencia/ausencia de especies, los puntos CH8, CH9 y CH10 (que corresponden a la porción superior de la cuenca) se apartan de los restantes siete (Fig. 9). Se realizó un NMDS con los mismos datos, que apoya la asociación antes mencionada (Anexo VI). Considerando los bajos valores de Bootstrap de algunos nodos del Cluster no pueden estimarse a partir de estos análisis más asociaciones.

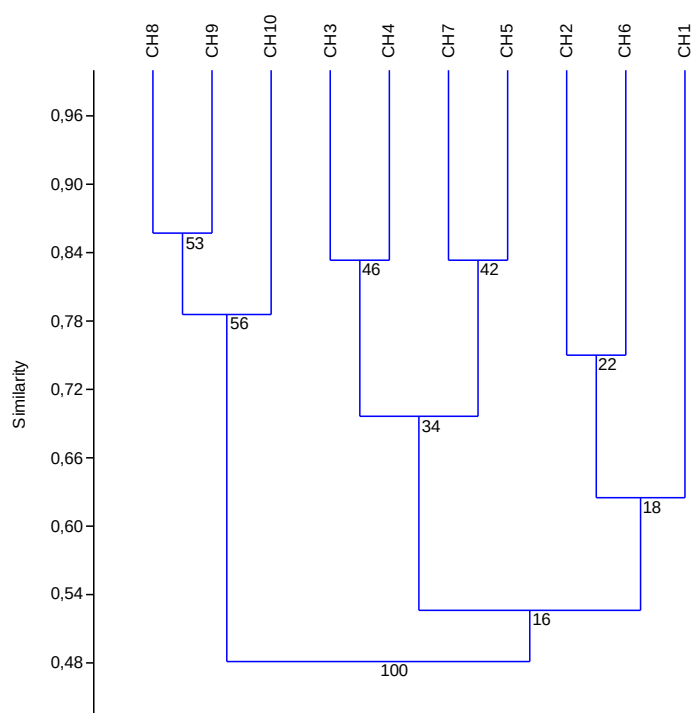


Figura 9. Cladograma realizado a partir de la matriz presencia-ausencia total de especies registradas para cada charco (larvas + adultos observados + adultos vocalizando). Índice de similitud empleado: Jaccard, ccc=0.7194, Bootstrap=1000.

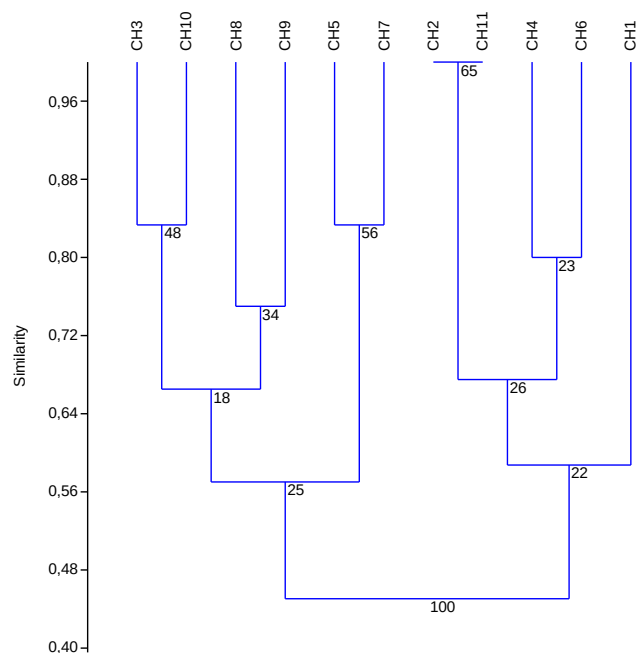


Figura 10. Cladograma realizado a partir de la matriz presencia-ausencia de adultos (observados y/o vocalizando). Índice de similitud empleado: Ochiai, ccc=0.7179, Bootstrap=1000.

Considerando únicamente la presencia-ausencia de adultos (Fig. 10), los puntos de muestreo se separan en dos grupos: CH1-CH2-CH4-CH6-CH11 y CH3-CH5-CH7-CH8-CH9-CH10. El primero de estos grupos se compone de los puntos con las concentraciones más altas de Clorpirifos en sedimento (marzo de 2015; ver tabla 4) y, a su vez, con el menor número de especies de anfibios (a excepción del CH4 que cuenta con 5 especies; CH1, CH2 y CH11: 3 especies, CH6: 4 especies), siendo estas las más comunes en la cuenca (*H. pulchellus*, *P. minutus*, *L. latrans* y, en menor medida, *L. latinasus*). Cuatro de los puntos que componen dicho grupo corresponden a pradera (CH2, CH4, CH6 y CH11) y uno a cultivo (CH1). Los puntos CH1 y CH11 se encuentran en la parte baja de la cuenca, CH2 y CH4 están en la subcuenca 18 (i.e. porción media de la cuenca al este del curso principal), el CH6 está en la porción media-superior de la cuenca. El segundo grupo, por su parte, se compone de un punto correspondiente a pradera (CH5), dos a cultivo (CH3 y CH8) y los tres de campo natural (CH7, CH9 y CH10). CH3 y CH5 corresponden a la región oeste de la cuenca (brazo corto del arroyo) mientras que CH7, CH8, CH9 y CH10 se encuentran en la porción superior de la cuenca.

De acuerdo con el conteo de larvas (Fig. 11) los puntos CH5, CH7 y CH8 se separan del resto. Este Cluster se ve apoyado por un ACP (Anexo VI) cuyos primeros dos componentes explican el 96,53% de la varianza. Los puntos antes mencionados son los que poseen la mayor diversidad de larvas (en cantidad de especies y número de larvas) y se corresponden con las menores concentraciones de Clorpirifos detectadas (Tabla 4).

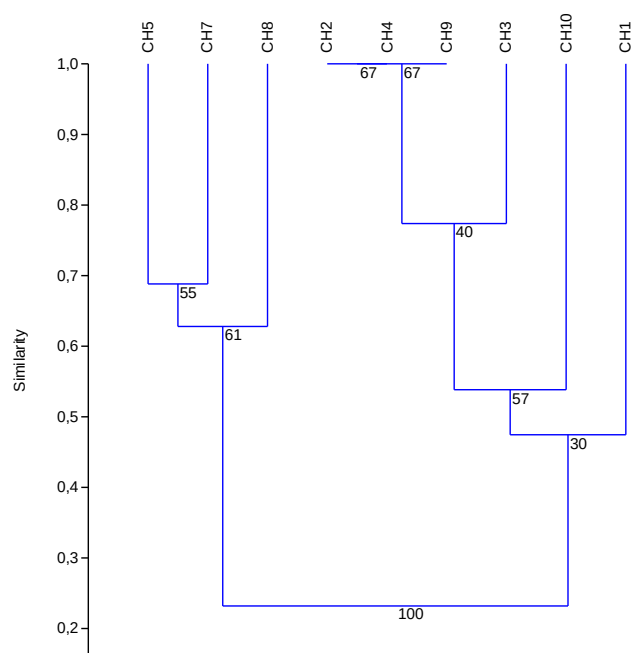


Figura 11. Cladograma realizado a partir del conteo de larvas ($\text{LN}(x+1)$ debido al alto contenido de ceros en la matriz) del mes de diciembre de 2014. Índice de similitud empleado: Bray-Curtis, $\text{ccc}=0.9356$, Bootstrap=1000.

En síntesis, en esta etapa se encontró que, respecto a Clorpirifos los charcos próximos a los puntos fríos apoyan el mapa de puntos calientes generado en SWAT; los charcos situados en puntos calientes no apoyan el mapa para ninguno de los dos compuestos; y los datos de Glifosato en los charcos próximos a los puntos fríos tampoco. A su vez, los valores modelados se ajustan a los medidos para Glifosato, pero no para Clorpirifos. Respecto a los anfibios, los análisis sugieren que el Clorpirifos podría tener un efecto en la diversidad tanto a nivel de adultos como de larvas (a mayores concentraciones del compuesto menores diversidades). Además, referido a la composición de especies, habría diferencias entre la porción superior de la cuenca (próxima a las nacientes) y el resto de la cuenca.

Análisis morfométrico

Las características morfológicas de las larvas, tanto ‘forma’ como ‘altura del músculo de la cola’ (AM), fueron medidas a partir de las fotografías (Fig. 3) correspondientes a las larvas de *H. pulchellus* colectadas en la campaña de campo de diciembre de 2014 (Tabla 9). No fue considerado el segundo muestreo (marzo de 2015) para este análisis debido a que no resultó representativo de todos los usos del suelo. En dicho muestreo respecto a *H. pulchellus* se colectaron (ver Tabla 7): 4 larvas en el CH3 (cultivo), 19 en el CH7 (campo, con resultados de fitosanitarios solo para Glifosato y AMPA), 16 en CH8 (cultivo) y 1 en CH9 (campo); no se cuenta con representación del uso ‘pradera’.

Tabla 9. ‘Forma’ y ‘altura del músculo de la cola’ promedio y desvío estándar de las larvas de *Hypsiboas pulchellus*, por charco, colectadas en Diciembre de 2014. AM: altura del músculo de la cola; Forma: largo de cuerpo/largo total; n: número de larvas medidas; Total larvas: total de larvas de la especie colectadas; n>40: número de larvas cuyo estadio de desarrollo era mayor del 40, según Gosner (1960).

	AM		Forma		n	Total larvas	n>40
	Promedio	Desvío estándar	Promedio	Desvío estándar			
CH1	0,3275	0,0965	0,3482	0,0123	8	9	1
CH2	0,0900	-	0,4528	-	1	1	0
CH3	0,2100	-	0,4116	0,0499	1	2	1
CH4	0,1800	-	0,3626	-	1	1	0
CH5	0,5857	0,0645	0,3164	0,0257	7	15	8
CH6	-	-	-	-	0	0	-
CH7*	0,3237	0,0835	0,3396	0,0309	30	99	21
CH8**	0,3955	0,0950	0,3616	0,0375	20	21	0
CH9	0,1500	-	0,4138	-	1	1	0
CH10	0,5500	-	0,3765	-	1	1	0

* se realizó muestreo aleatorio de 30 individuos a ser medidos (entre los 78 cuyo estadio era menor o igual a 40)

**un individuo no pudo ser medido

Cabría esperar que el uso del suelo sea un factor determinante sobre ambas variables de respuesta (Fig. 12). Esto es más claro para la altura del músculo de la cola (AM) pero también es esperable para forma (al menos entre campo y cultivo). Al modelar cada variable de respuesta con ‘usos’ como variable explicativa y estadio como aleatoria, en el caso de la forma se obtuvo diferencias entre ‘Campo’ ($p < 0,0001$) y ‘Cultivo’ ($p = 0,0162$), y para AM todos

los usos presentaron un p-valor por debajo de 0,001. Si bien estos resultados sugieren que los usos tendrían un efecto directo sobre las variables (cuerpos más grandes/colas más cortas en relación al largo total, en cultivo respecto de campo y pradera; y AM bajos en campo natural, medios en cultivo y altos en pradera), no podemos afirmar que efectivamente así sea, ya que, para ello deberíamos considerar todos los factores que se cree están influenciando a la variable de forma conjunta.

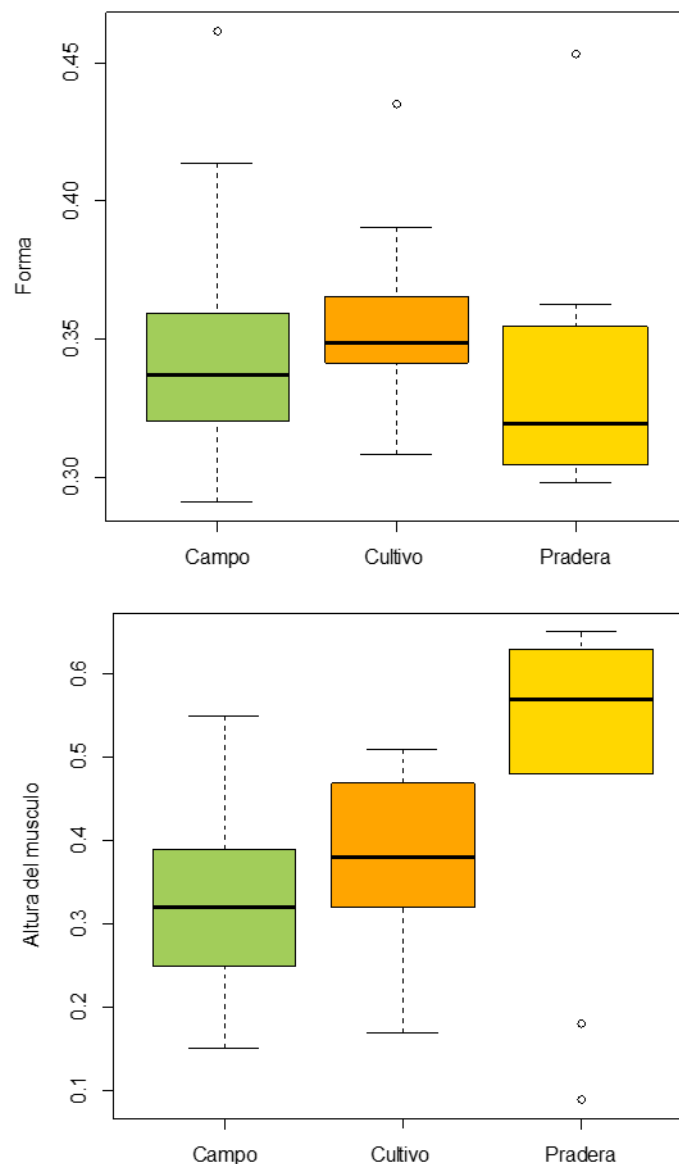


Figura 12. Forma (largo de cuerpo/largo total) y altura del músculo de la cola (AM) de *H. pulchellus* en función de los usos del suelo. Se presentan los datos con su desvío estándar y su mediana.

Tabla 10. Modelos con mejor ajuste (menor valor de AIC) realizados para logaritmo de la forma y AM como variables de respuesta y con los diferentes fitosanitarios como variable explicativa. En todos los casos se indica si el modelo incluye el efecto aleatorio del estadio. El p-valor se indica entre paréntesis. FS: producto fitosanitario; NA: sin datos; n° charcos: número de charcos donde se detectó el compuesto. Campo natural fue tomado como intercepto.

Fitosanitario	Variable	Intercepto	FS	Cultivo	Pradera	FS*cultivo	FS*pradera	Estadio	n° charcos
Cipermetrina	log(forma)	-1,0684 (2e-16)	0,0075 (0,0001)	0,0297 (0,1651)	-0,0837 (0,0177)	NA	NA	no	2
	AM	0,2905 (0,0000)	-0,0059 (0,0018)	0,0828 (0,0001)	0,1865 (0,0000)			si	
AMPA	log(forma)	-0,9222 (0,0000)	-7,4923 (0,0120)	-0,1336 (0,0527)	0,0592 (0,5256)	7,5185 (0,0116)	6,3009 (0,0342)	si	7
	AM	0,3640 (0,0000)	-4,2278 (0,1014)	-0,0478 (0,4256)	-0,0618 (0,4469)	4,3074 (0,0948)	4,9094 (0,0598)	si	
Glifosato	log(forma)	-1,0684 (2e-16)	-5,6666 (0,0002)	0,0198 (0,5651)	0,2762 (0,0018)	5,6837 (0,0002)	NA	no	5
	AM	0,2840 (0,0000)	0,0862 (0,0499)	0,0462 (0,1562)	0,1353 (0,0000)			si	
Clordano	log(forma)	-1,0639 (0,0000)	0,4352 (0,0599)					si	2
	AM	0,2818 (0,0000)	0,3433 (0,2426)	0,0745 (0,0096)	0,1399 (0,0000)			si	
Endosulfán alfa	log(forma)	-0,9207 (0,0000)	-1,4987 (0,0167)	-0,1156 (0,0628)	-0,1486 (0,0311)			si	1
	AM	0,3855 (0)	-1,1231 (0)					si	
Endosulfán sulfato	log(forma)	-1,0493 (0,0000)	-0,0043 (0,8078)					si	1
	AM	0,2833 (0,0000)	-0,0359 (0,0405)	0,1166 (0,0000)	0,1428 (0,0000)			si	
Hexacloro-benceno	log(forma)	-1,0493 (0,0000)	-0,0822 (0,8078)					si	1
	AM	0,2833 (0,0000)	-0,0682 (0,0405)	0,1166 (0,0000)	0,1428 (0,0000)			si	
Mirex	log(forma)	-1,0516 (0,0000)	0,0104 (0,8799)					si	2
	AM	0,2831 (0,0000)	-0,1670 (0,0405)	0,1327 (0,0000)	0,1436 (0,0000)			si	
o.p. DDE	log(forma)	-1,0493 (0,0000)	-0,0822 (0,8078)					si	1
	AM	0,2831 (0,0000)	-0,1670 (0,0405)	0,1327 (0,0000)	0,1436 (0,0000)			si	
p.p. DEE	log(forma)	-1,0587 (0,0000)	0,0601 (0,3636)					si	4
	AM	0,2831 (0,0000)	-0,1670 (0,0405)	0,1327 (0,0000)	0,1436 (0,0000)			si	

Los modelos con mejor ajuste para cada fitosanitario como variable explicativa tanto de la 'forma' como de la AM se presentan en la Tabla 10 (en el Anexo VII se incluyen todos los análisis realizados, con su correspondiente AIC). A excepción de p.p. DDE que se encontró en cuatro puntos, los restantes compuestos persistentes se hallaron únicamente en uno o dos puntos. Esto llevó a generar una matriz con un elevado número de ceros (Montgomery, 2008), por lo que no se consideraron los resultados obtenidos en los modelos para dichos compuestos. Lo mismo ocurre con Cipermetrina que se halló únicamente en dos puntos, en cada uno de los cuáles se contaba únicamente con una larva medida.

En cuanto a AMPA, para AM su interacción con el uso pradera fue marginalmente significativa ($p=0,0598$), sugiriendo que este producto se comportaría de manera diferente según el uso del suelo. Con 'logaritmo de la forma' se comportó en forma similar, resultó haber un efecto de la interacción entre cultivo y la concentración de AMPA y entre pradera y la concentración AMPA.

El Glifosato presentó un efecto significativo tanto sobre el 'logaritmo de la forma' ($p=0,0002$) como sobre la AM ($p=0,0499$), exhibiendo en ambos modelos diferencias entre pradera y campo natural (en pradera el músculo sería más alto que en campo pero la forma sería mayor, i.e. las colas serían más cortas en relación al largo total). Para la variable 'logaritmo de la forma' resultó significativa la interacción entre cultivo y la concentración del producto ($p=0,0002$).

En el gráfico AM en función de la concentración de Glifosato (Fig. 13), parece ser que, tanto en 'cultivo' como en 'pradera' (si bien uno de los grupos se compone únicamente de un organismo) al aumentar la dosis del fitosanitario aumentara la media de la variable de respuesta. Sin embargo en 'logaritmo de la forma' en función de Glifosato, al aumentar la dosis del fitosanitario en 'cultivo' la media de la variable de respuesta parecería permanecer constante (aunque con mayores desvíos), mientras que en 'pradera' (si bien, nuevamente, uno de los grupos se compone únicamente de un organismo) pasaría que a mayor concentración de Glifosato la variable es menor. Esto indica que deberían estudiarse las interacciones entre usos y la concentración de los diferentes compuestos para poder decir qué efecto puede tener un factor sobre cualquiera de las variables de respuesta en estudio.

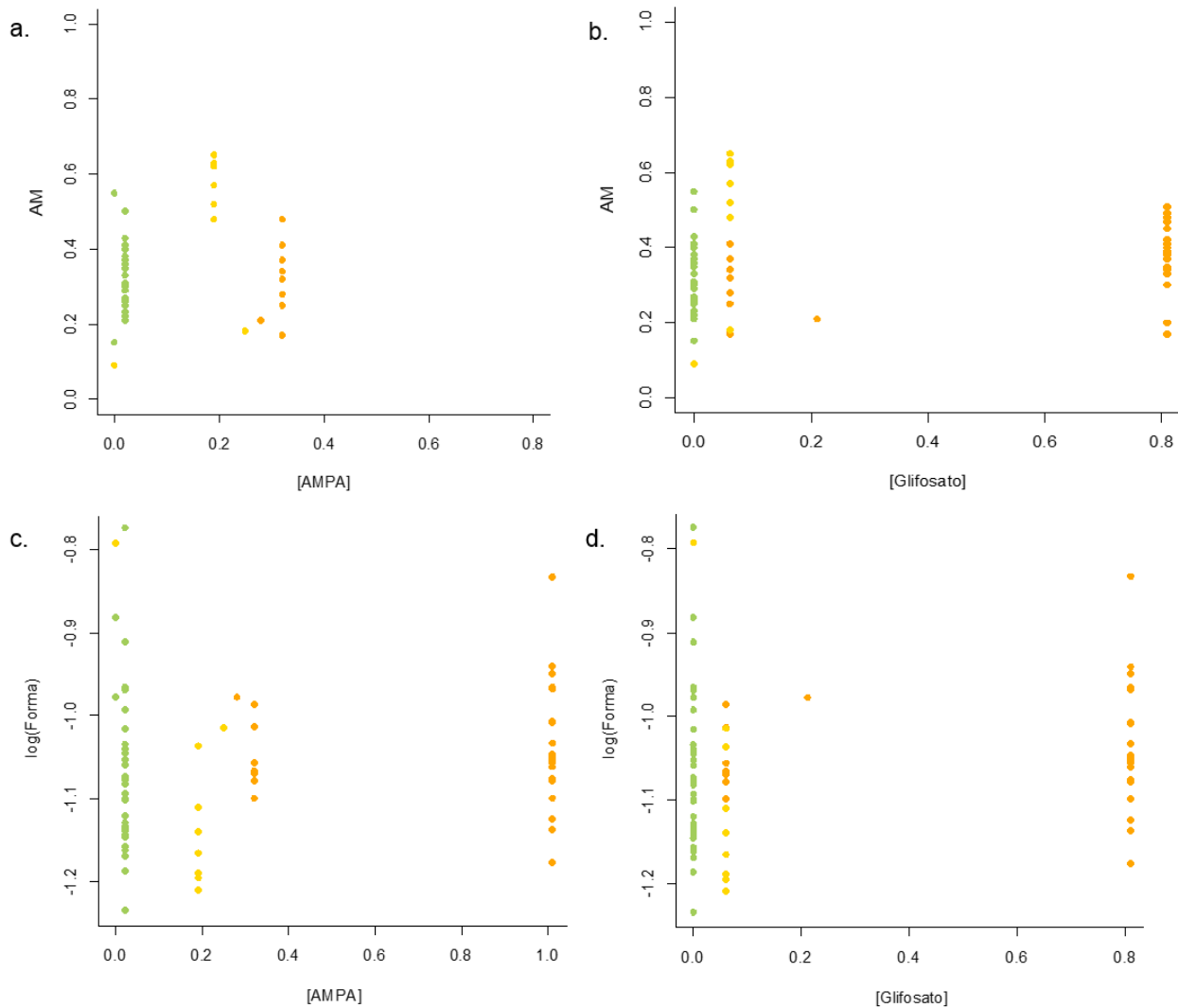


Figura 13. a. Altura del músculo de la cola (AM) en función de la concentración de AMPA; b. AM en función de la concentración de Glifosato; c. logaritmo de la forma en función de la concentración de AMPA; d. logaritmo de la forma en función de la concentración de Glifosato. Anaranjado: 'Cultivo'; Verde: 'Campo natural'; Amarillo: 'Pradera artificial'.

Análisis de especies indicadoras

Este análisis consideró de forma independiente los usos del suelo, la presencia de Glifosato, la presencia de AMPA y la presencia de contaminantes orgánicos persistentes (COPs). Como ya se mencionara, en todos los casos se emplearon los valores correspondientes al primer muestreo (diciembre de 2014) debido a que fue en dicho muestreo donde se registró la mayor diversidad de anfibios (8 de las 9 especies registradas; Tabla 6). Si bien Cipermetrina y Clorpirifos son de uso actual no se los incluyó en el análisis ya que

Cipermetrina se halló solo para dos puntos y Clorpirifos fue detectado únicamente en el muestreo de marzo de 2015 (Tabla 4).

De acuerdo con el análisis de especies indicadoras llevado a cabo en R®, ninguna de las especies presentes en la cuenca de estudio resultó ser indicadora de la presencia de Glifosato, de AMPA o de contaminantes orgánicos persistentes (COPs), ni tampoco del uso del suelo, ya que ninguna cumplió con la condición de presentar un valor del indicador mayor de 70 y un p-valor menor de 0.05.

Discusión

En el presente trabajo se pusieron a prueba abordajes que pueden resultar útiles para mejorar la gestión ambiental, en particular para el monitoreo de los impactos de los productos fitosanitarios. Lo que se pretendió mostrar es que estos abordajes pueden generar información útil para la toma de decisiones de gestión, más que procurar que los resultados sean concluyentes. Se modeló de manera exitosa el comportamiento del Glifosato en la cuenca, generando un mapa de exportación-retención de dicho compuesto. A partir de muestras de suelo, se detectaron en la cuenca tres productos fitosanitarios de uso actual (Glifosato/AMPA, Cipermetrina y Clorpirifos) y cinco COPs (Clordano, Endosulfán, Hexaclorobenceno, Mirex y DDT). Respecto a los anfibios, los análisis sugieren que el Clorpirifos tiene un efecto negativo en la diversidad de adultos y larvas. Además, habría diferencias, en la composición de especies entre la porción superior (próxima a las nacientes) y el resto de la cuenca. Finalmente, parecería ser que el uso del suelo afecta la morfología de las larvas de *H. pulchellus*, incidiendo sobre el efecto que ciertos fitosanitarios provocan en ellas (efectos diferenciales por uso del suelo de AMPA y Glifosato). En general, todos los resultados del presente trabajo son una primera aproximación que debería ser perfeccionada utilizando mejores datos (e.g. datos más reales para la entrada del modelo), calibrando el modelo y realizando muestreos más exhaustivos).

Modelación en SWAT

SWAT resultó ser una herramienta útil para la modelación del comportamiento ambiental del Glifosato, aun cuando los datos de ingreso al modelo fueron simplificados para generar una primera aproximación a escala de cuenca. Es decir, ésta podría ser una herramienta ventajosa para el ordenamiento territorial y el monitoreo de la calidad ambiental, que permitiría predecir el riesgo de exportación o retención de diferentes productos fitosanitarios al interior de una cuenca determinada a partir de información relativamente sencilla de coleccionar. Generalmente resulta dificultoso disponer de todos los datos de ingreso al modelo con suficiente nivel de detalle (en especial los de clima), o los datos de uso de productos fitosanitarios a nivel de predio. Sin embargo, la posibilidad de simplificar las variables de ingreso permite identificar potenciales conflictos o las posibles consecuencias de distintas alternativas de gestión en un plazo de tiempo razonable, y priorizar los sectores del área de estudio en los que es necesario generar información de mayor resolución.

El empleo de modelos ambientales como predictores en evaluaciones de impacto ambiental permitiría saber a priori cuál será el destino, o la tendencia, de cierto fitosanitario en el ambiente, en qué compartimento es esperable encontrar cuál producto y sus concentraciones (incluyendo estimaciones de acumulación). Permitiría además, estimar cómo responderá el sistema ante un cambio de dosis, método de aplicación o introducción de un nuevo producto.

Posibilidades de mejora de los datos de ingreso a SWAT

Los insumos proporcionados al SWAT para la modelación fueron: el DEM; los usos del suelo, con 6 categorías (agua, campo, cultivo, forestal, monte, urbano); los tipos de suelo, con 4 grupos de suelo; y los datos de clima obtenidos de un simulador global. El manejo indicado incluyó a las praderas dentro de 'cultivo' y asumió un mismo manejo para todos los predios. Además, solo se consideró los cultivos de verano. Estos insumos en general pueden mejorarse en forma significativa.

El DEM podría haber sido de mejor resolución (fue de 90m, pudiendo ser hasta de 5m), la resolución a emplear debiera ser la misma que la de la imagen satelital a partir de la cual se

realiza la clasificación de usos del suelo (30x30 en este caso). Incluso la distribución de tipos de suelos en la cuenca puede ser corregida, ya que en la equivalencia con los suelos de USDA se perdió resolución (se bajó de 15 unidades de suelo CONEAT a cuatro tipos de suelos USDA).

La imagen satelital a partir de la cual se realizó la clasificación es de marzo de 2014, lo que correspondería a los usos durante el ciclo de cultivo de verano 2013-2014. Los datos medidos corresponden al ciclo de cultivo siguiente. Esto se debió a que primero se realizó la etapa de preparación de insumos para la modelación y, posteriormente, las campañas de campo. A futuro sería interesante modelar el ciclo de cultivo sobre el cuál se tienen valores medidos.

La información utilizada para modelar, debe ser mejorada en forma sostenida para futuros estudios. Se recomienda ajustar nuevas clasificaciones de tipo y usos de suelos, sistematizar los datos de clima a partir de las estaciones a nivel local (asegurando la existencia de series temporales de datos robustas) y ajustar los usos y aplicaciones de fitosanitarios según las prácticas de los agricultores de la cuenca, discriminando entre los distintos tipos de cultivos y praderas implantadas. En relación a esto último, si se diferenciara en tipos de cultivo (incluidas las praderas) podría indicarse manejos diferenciales para cada cultivo. Idealmente se debería consultar a los productores o a sus planes de manejo, a fin de modelar con los datos exactos proporcionados por ellos.

Previo a la validación del mapa generado, debería realizarse la calibración del modelo a fin de poder predecir concentraciones de exportación-retención. En este sentido debe considerarse que mayor precisión conlleva más tiempo (Neitsch et al., 2002; Bannwarth et al., 2014). En general, para la gestión ambiental y planificación territorial puede ser más útil y relevante tener una herramienta que rápidamente arroje tendencias generales, que es precisamente lo que se demostró en este estudio que el SWAT es capaz de hacer.

Cabe destacar que el manejo del SWAT tiene sus desafíos, debiendo asumir que existe una curva de aprendizaje que se debe transitar necesariamente, antes de poder incorporarlo rutinariamente como herramienta de apoyo a la planificación y/o toma de decisiones.

Fitosanitarios en suelo

Podemos afirmar que determinados productos (Glifosato, Cipermetrina, Clorpirifos, Clordano, Endosulfán, Hexaclorobenceno y Mirex) o sus productos de degradación (AMPA y metabolitos de DDT) se encuentran en la cuenca de estudio y que otros tantos (ver Anexo IV) no. Sin embargo, existe un gran número de compuestos que, por no estar incluidos en el análisis multirresiduos realizado, no sabemos si están presentes. En este trabajo se evidencia la acumulación potencial de dos fitosanitarios en la cuenca de estudio (Glifosato y Clorpirifos) y la presencia de 8 compuestos diferentes (5 de ellos COPs prohibidos en nuestro país). Sin embargo, esto no significa que no se estén empleando en la cuenca del Arroyo de La Virgen otros compuestos que no hayamos logrado detectar. Los expertos consultados indicaron compuestos a analizar que no están contemplados en el análisis multirresiduos realizado por el laboratorio de DINAMA (2-4D, MCPA, Flumetsulam, Fluroxipyr, Clorantraniliprol, Triflumurón, Teflubenzurón), algunos de ellos de uso incipiente en nuestro país.

Se ha reportado un amplio rango en la vida media y persistencia de Clorpirifos en el suelo que va de unos pocos días hasta 4 años, dependiendo de la tasa de aplicación, el tipo de ecosistema y factores ambientales varios (Watts, 2012).

En cuanto al Glifosato, su persistencia en suelo no es fácil de predecir, ya que no se trata de una característica intrínseca del herbicida, sino que es controlada por factores propios del herbicida, del suelo y de las condiciones ambientales, y por ello puede variar de un lugar a otro y en un mismo lugar de un año a otro (Kogan y Alister en INIA 2013). En el Informe Glifosato (CONICET, 2009) se afirma que sería de hasta seis meses, sin embargo Ríos y colaboradores (2010) registraron residuos de Glifosato en suelos de Uruguay en áreas en las que no había habido aplicaciones en los últimos tres años.

Sobre el comportamiento y la persistencia de fitosanitarios en suelo, no se encontraron estudios realizados en nuestro país. Sería interesante contar con estudios de este tipo ya que la persistencia y comportamiento en general de los fitosanitarios en suelo depende mucho de la composición de los mismos.

A nivel de normativas, en Uruguay existen decretos y resoluciones ministeriales que regulan el uso de productos fitosanitarios en lo referido por ejemplo a las distancias de aplicación a

cursos de agua (Res. MGAP Febrero 2008), centros poblados (Res. MGAP Mayo 2004) y escuelas rurales (Res. MGAP Marzo 2011), etc. Sin embargo no existe normativa a nivel nacional que refiera a límites de concentración de determinados productos fitosanitarios en las diferentes matrices ambientales (más allá de la Ley N° 16.170 de 1991, que faculta al Poder Ejecutivo a prohibir la utilización, venta y exportación de vegetales, productos o subproductos de origen vegetal contaminados con residuos de plaguicidas en niveles superiores a los establecidos en el Codex Alimentarius o por los requerimientos, en la materia, del país de destino).

Si bien, como ya se mencionó, son escasos en Uruguay los estudios que incluyen cuantificaciones de fitosanitarios en suelo, existen algunos estudios que pueden tomarse como referencia. Por ejemplo en el litoral del país, Ríos y colaboradores (2010) encontraron concentraciones en suelo de Glifosato, AMPA y Clorpirifos por debajo de los 0.1 mg/kg, en sitios cultivados con soja. Este resultado difiere de lo hallado aquí, donde para cultivo de soja (CH1) se cuantificaron 0.32 (diciembre) y 0.69 (marzo) mg/kg de AMPA y 1.25 mg/kg de Clorpirifos; en cuanto a Glifosato sí coinciden los resultados. En ambientes naturales (campo o monte nativo) Ríos y colaboradores (2010) llegaron a registrar concentraciones entre 0.15 y 0.20 mg/kg tanto de Clorpirifos como de Glifosato. Estas determinaciones no coinciden con las realizadas aquí para campo natural donde se hallaron menores concentraciones de Clorpirifos pero mayores de Glifosato (Clorpirifos entre 0 y 0.13 mg/kg y Glifosato entre 0 y 0.81 mg/kg). Por su parte, Sawchik y Pérez-Bidegain (2012) también en el litoral uruguayo, llegaron a encontrar concentraciones de Glifosato y AMPA de 3.0 mg/kg y 1.4 mg/kg respectivamente, en chacras comerciales.

En cuanto a las consecuencias que estas concentraciones de fitosanitarios podrían ocasionar sobre la biota, en Argentina, Casabé y colaboradores (2007) (en un estudio dónde aplicaron Clorpirifos y Glifosato según proporciones recomendadas para cultivos de soja, analizando los efectos luego de 10 días) obtuvieron efectos sobre aspectos comportamentales de la lombriz de tierra y daño genético con una concentración en suelo de Clorpirifos similar a la hallada en las muestras con concentraciones más altas de este estudio (CH1 y CH11). A su vez, con concentraciones no detectables de Glifosato reportan que se afectó la supervivencia de los descendientes y además que las lombrices evitaron los suelos tratados con Glifosato. Es decir, ambos productos en las concentraciones aquí detectadas podrían ocasionar daño al menos a parte de la biota del suelo.

Modelado en función de lo observado

El valor que SWAT proporciona para cada producto retenido en suelo refiere a cada subcuenca. Sin embargo, en general cada subcuenca contiene más de un uso del suelo. Es decir, la concentración de producto retenido en suelo por subcuenca dependerá de cuánto 'cultivo' haya en la misma, ya que fue para el único uso que se indicó la adición de fitosanitarios, entre otros factores. Si bien cada punto de muestreo se encuentra en una subcuenca de las modeladas en SWAT, el valor otorgado por el modelo es demasiado general para realizar la comparación con puntos de medición específicos.

En cuanto a la diferencia observada en la concentración de Glifosato y Clorpirifos retenidas en suelo entre años de modelación, esta podría deberse a que el Glifosato es altamente soluble en agua mientras que el Clorpirifos es de baja solubilidad en dicha matriz. Por lo tanto, en el año en que coincidieron eventos de lluvia con la aplicación de los productos pudo ocurrir que el Glifosato se 'perdiera' por escorrentía o hacia aguas subterráneas diluido en el agua de lluvia, mientras que el Clorpirifos, por ser poco soluble en agua, permaneciera en el sitio de aplicación.

En relación a los mapas de valores exportados y retenidos, ambos (para Glifosato y para Clorpirifos) son prácticamente iguales. Esto sugiere que SWAT determina la exportación de los productos mayormente en función de las características de la cuenca que de las propiedades de los químicos. Los mapas de puntos calientes sin embargo, permiten ver claramente qué regiones de la cuenca podrían representar un problema. De cualquier manera, en ambos casos sería bueno muestrear los sitios que aparecen en el mapa como sitios de gran retención (en suelo) y los sitios de gran exportación (en agua). Los dos puntos de muestreo más próximos a los puntos fríos (de retención) son los que presentan los valores más elevados de Clorpirifos en suelo. Esto representa un apoyo al mapa, por lo que, más allá de que los datos reales no se correlacionen con los simulados para este compuesto, sería altamente recomendable muestrear sedimentos en los sitios de retención. Finalmente, los sitios de retención se encuentran en la zona baja de la cuenca, lo cual era esperable debido a que por escorrentía se espera que los productos se acumulen en la parte baja de la misma.

El empleo de Glifosato en praderas artificiales es común, debido a que algunas leguminosas son tolerantes al Glifosato en bajas concentraciones, generándose un efecto diferencial

sobre gramíneas y leguminosas (Terra y García-Préchac, 1998; Julio Rodríguez Lagreca com. per.). Sin embargo, se esperaba hallar menores concentraciones de Glifosato en predios con praderas artificiales en relación a los de uso agrícola. Esta diferencia no fue evidente, incluso la muestra con mayor concentración de Glifosato fue tomada en un sitio de pradera artificial. En general, las variaciones en concentración de Glifosato entre predios cultivados y con pradera artificial fueron similares.

Clorpirifos fue detectado en todos los sitios muestreados a excepción de las nacientes (CH10). Julio Rodríguez Lagreca (com. per.) refirió que este producto se aplica tanto en campo natural como en pradera artificial cuando, en busca de mejorar el forraje, se siembran especies que son atacadas por la lagarta (mariposa nocturna cuya oruga causa grandes daños a los cultivos) bajo ciertas condiciones (e.g. sequías). Aquí cabe recordar que el segundo muestreo (en cuyos análisis se detectó Clorpirifos) se realizó durante una sequía prolongada.

Finalmente, este análisis se realizó sobre la base de once puntos de muestreo (tres de cultivo, tres de campo natural y cinco de pradera artificial). En la elección de dichos puntos se intentó que fueran representativos de las diferentes condiciones que se dan dentro de la cuenca (usos de suelo y regiones de la cuenca diferentes). Sin embargo, hubiese sido interesante contar con más puntos para cada uso del suelo y muestrear en diferentes estaciones (al menos sumar invierno). A su vez, sería también interesante contar con otra cuenca de similares características (i.e. similar tamaño, tipos de suelo y pendientes), pero con diferente intensificación de uso del suelo, a fin realizar un estudio comparativo que permita la validación del modelo eliminando el 'ruido' que puede estar generando la llegada de fitosanitarios de un punto a otro por escorrentía.

Anfibios como indicadores

Se registró un total de 9 especies correspondientes a cuatro familias (Hylidae, Leptodactylidae, Leiuperidae y Bufonidae), de las cuales únicamente 4 especies se encontraron tanto en estadio larval como adulto (*H. pulchellus*, *P. minutus*, *P. gracilis* y *L. latrans*). En cuanto a la composición de especies, habría diferencias entre la porción superior (próxima a las nacientes) y el resto de la cuenca. En relación directa con el uso que se hace

de la cuenca, los análisis sugieren que el Clorpirifos tiene un efecto negativo en la diversidad tanto de adultos como de larvas. Mientras que el uso del suelo parece tener un efecto sobre la morfología de las larvas de *H. pulchellus*, incidiendo sobre el efecto que ciertos fitosanitarios provocan en ellas (efectos diferenciales por uso del suelo de AMPA y Glifosato).

Composición de especies

La cantidad de especies registrada resulta razonable, considerando que se realizaron únicamente dos muestreos (solo uno durante el período de mayor actividad de anfibios) y teniendo en cuenta la bibliografía existente (Canavero et al., 2010; Bolzan et al., 2016). En Argentina, Attademo y colaboradores (2005) en un estudio en regiones sojeras, reportaron en la región de Entre Ríos, la presencia de 11 especies, correspondientes a 4 familias (Bufonidae, Leptodactylidae, Leiuperidae y Microhylidae); mientras que, Bionda y colaboradores (2011) hallaron siete especies de cuatro familias (Bufonidae, Leiuperidae, Cycloramphidae, and Leptodactylidae) en agroecosistemas de Córdoba.

En este estudio la mayor diversidad registrada fue de adultos y en diciembre. Dicho muestreo fue realizado todo en una misma noche, pudiendo perderse el registro de especies que estuvieran presentes en baja densidad y no se encontraran vocalizando. Pudo ocurrir además que el factor temporal jugara en contra para el registro de ciertas especies en determinados puntos, ya que el muestreo se comenzó 20:30 en la parte superior de la cuenca y se terminó sobre la 1:40 en el punto más bajo de la misma. Existen diferencias temporales en los picos de actividad de las especies; algunas vocalizan más temprano que otras o lo hacen por períodos de tiempo diferentes (Boquimpani et al., 2007; Gomes y Rossa-Feres, 2007; Bardier et al., 2014).

Potencialmente podrían haberse registrado hasta 16 especies (ver Anexo I). Como ya se mencionó, tres de ellas son de reproducción explosiva luego de copiosas lluvias (*S. berthae*, *O. americanus* y *E. bicolor*). No era esperable registrar esas especies en el presente trabajo (al menos no como adultos) ya que ninguno de los muestreos coincidió con eventos de lluvia abundante. Además, los ejemplares del género *Rhinella* son difíciles de ver si no se encuentran vocalizando ya que habitan en cuevas.

La lista de especies halladas resulta por lo tanto ajustada a la zona y al esfuerzo de muestreo, si bien sería esperable haber registrado a las especies *Dendropsophus samborni*,

Scinax squalirostris y *Leptodactylus mystacinus*. Respecto a *S. squalirostris*, se encuentra muy asociada a la vegetación periférica, especialmente a la presencia de caraguatales, donde se refugia en sus axilas. En general en la cuenca, este tipo de vegetación no es muy abundante debido al manejo intensivo practicado en ella ya sea como áreas de cultivo como de pastoreo. En cuanto a *L. mystacinus*, el Dr. Raúl Maneyro (profesor adjunto de la Sección Zoología de Vertebrados, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, UdelaR; com. per.) señaló que suele encontrarse en simpatria con *L. gracilis* y *L. latinasus*, siendo siempre la más abundante *L. latinasus*, seguida por *L. gracilis*. Pudo haber ocurrido que *L. mystacinus* estuviera presente en la cuenca pero no fuera detectada debido a su baja abundancia, sumado al bajo esfuerzo de muestreo y la similitud de las vocalizaciones de las tres especies. De todas formas, *L. mystacinus* es de las tres especies la más difícil de detectar (Bardier et al., 2014). En la misma línea, hubiera sido esperable que *L. gracilis* estuviera presente en los mismos puntos que *L. latinasus*. Una explicación posible es que el pico de actividad de esta especie corresponda a las primeras horas de la noche, cuando fueron muestreados los puntos de la porción superior de la cuenca. Bardier y colaboradores (2014) reportaron que estas tres especies no se superponen en su clímax de actividad, presentando cierta partición en el nicho acústico. En este sentido, sería interesante realizar nuevos muestreos, considerando el factor temporal, a fin de dilucidar si realmente *L. latinasus* habita únicamente en la región superior de la cuenca.

Las diferencias de ocurrencia de especies observadas entre muestreos pueden atribuirse a la variación estacional en la actividad de las comunidades de anfibios de nuestro país. En un estudio realizado en el arroyo Espinas (Maldonado, Uruguay), Canavero y colaboradores (2008) encontraron que el modelo que describe mejor el patrón de actividad de los anfibios de la región es sinusoidal, e incluye sólo al mes como variable explicativa. Estos autores registraron a partir de vocalizaciones un total de 10 especies, de las cuales en diciembre registraron entre 6 y 7 (constituyendo el pico del modelo), mientras que en marzo entre 3 y 5.

En línea con lo anterior, Camargo y colaboradores (2005) encontraron que *P. gracilis* tiene su pico de actividad en primavera (octubre-noviembre), lo que se corresponde con los resultados del presente estudio, ya que dicha especie fue registrada únicamente en el muestreo correspondiente al mes de diciembre.

La influencia que las características de cada charco (e.g. tamaño, profundidad, cobertura vegetal y vegetación periférica) podrían tener sobre las especies que lo habitan, podría estar generando ‘ruido’ en los análisis. Existen estudios en la región (Peltzer et al., 2006) que relacionan la presencia de ciertas especies con determinadas características de los cuerpos de agua. De todas formas, los patrones aquí observados no se condicen con los resultados del mencionado estudio.

De acuerdo con nuestros resultados, la cuenca del Arroyo de La Virgen sirve como sitio de cría a 4 especies. Sin embargo, debido al bajo esfuerzo de muestreo no podemos afirmar que no esté sirviendo como sitio de cría también a otras especies. *L. latrans* en estadio larval se registró en un único sitio (CH8) pero como adulto fue de las más abundantes en la cuenca, habiéndose registrado en 9 de los 11 sitios de muestreo. El muestreo de larvas de esta especie no es representativo de la forma realizada en el presente estudio ya que presenta cuidado parental, por lo cual las larvas se encuentran en cardumen y acompañadas del progenitor. Llama la atención que no se hallaran larvas del género *Scinax* y de *O. americanus*. De este último podría ser que hubiera en la cuenca pero sus larvas metamorfosearan previo al muestreo de diciembre.

El punto con mayor diversidad de larvas fue el CH7, ubicado en la porción superior de la cuenca. CH7 fue el de menor superficie muestreado, presentando 100% de cobertura vegetal, siendo peridomiciliario (ubicado a no más de 100 m de una vivienda) y correspondiendo a campo natural mejorado. En los puntos CH6 y CH11 no se registraron larvas. En el caso del CH11 esto pudo deberse a que fue muestreado solo en marzo, campaña donde se registraron muy pocas larvas en general. El CH6 en diciembre era muy somero (aprox. 10cm de agua) y no presentaba cobertura vegetal; en marzo estaba seco. Es decir, el no encontrar larvas en este punto podría atribuirse a sus características propias y no al uso del suelo en que está inmerso.

La diversidad (riqueza y abundancia) de anfibios de la cuenca parece acompañar el gradiente ambiental naciente-desembocadura. No existen trabajos en nuestro país que aborden la diversidad de anfibios en relación a gradientes ambientales. Si los hay para peces y la diversidad disminuye conforme se acerca a la desembocadura (e.g. Texeira de Mello, 2007; Stebniki et al., 2016). Sería interesante contar con estudios de este tipo para anfibios, a fin de lograr separar los efectos causados por el gradiente ambiental de los ocasionados, por ejemplo, por el uso de productos fitosanitarios.

Relación con usos del suelo

Se han encontrado asociaciones altamente variables entre la intensidad agrícola y los anuros (Koumaris y Fahrig, 2016). Las poblaciones de estos organismos que habitan áreas agrícolas están expuestas a una mezcla de productos químicos agrícolas y están potencialmente en riesgo de efectos toxicológicos aditivos, sinérgicos o antagónicos. Algunos estudios han reportado efectos tóxicos de mezclas de productos fitosanitarios sobre parámetros como la supervivencia, el desarrollo o inmunológicos (Mann et al., 2009).

Si bien algunos fitosanitarios tienen el potencial de afectar directamente a las poblaciones de anfibios causando efectos letales, las concentraciones que ocurren en el ambiente rara vez son tan altas como para llegar a ese nivel a gran escala (Mann et al., 2009). Sin embargo, existe evidencia de diversos efectos crónicos que podrían llevar a la disminución de las poblaciones. Por ejemplo, la exposición a fitosanitarios puede conducir a la supresión del sistema inmunológico (e.g. Lescano et al., 2009; Brodeur, 2010; Lajmanovich et al., 2012; Attademo et al., 2015), evitando así que los anfibios desarrollen una respuesta normal y adecuada contra patógenos (Mann et al., 2009; Brühl et al., 2011).

El hecho de que ninguna especie resultara ser clara indicadora de la presencia de fitosanitarios en el ambiente, podría deberse a que ningún producto se halle en concentraciones que permitan ver un efecto de este tipo (i.e. baja concentración en el ambiente). Esto también podría atribuirse al bajo número de muestras obtenidas, a la cantidad de puntos de muestreo considerados, o bien a la diversidad de factores que pueden estar operando en conjunto en la cuenca.

Parte del patrón de distribución de especies observado en este trabajo, podría estar asociado a que ciertas especies hayan generado tolerancias frente a ciertos productos mientras que otras no. Al considerar el contexto agrícola de diferentes poblaciones, Cothran y colaboradores (2013) encontraron que las que se situaban más cerca de la agricultura eran más resistentes al Clorpirifos que las poblaciones situadas lejos de la agricultura, concluyendo que, si bien los fitosanitarios pueden tener una serie de efectos nocivos sobre las especies no blanco, las poblaciones de anfibios pueden ser capaces de desarrollar resistencia a los fitosanitarios. En esta línea, Hua y colaboradores (2013a) hallaron que a concentraciones subletales y ecológicamente relevantes de un insecticida común (Carbaryl), los anfibios pueden adquirir tolerancia adaptativa aún dentro de la misma generación,

afirmando que los patrones de tolerancia inducida dependen de la concentración del insecticida produciéndose en etapas muy tempranas del desarrollo. Por otra parte, Hua y colaboradores (2013b) encontraron una amplia variación en la tolerancia a los insecticidas inhibidores de la acetilcolinesterasa y evidencia de tolerancia cruzada, concluyendo que las poblaciones de anfibios con tolerancia a un fitosanitario pueden ser tolerantes a otros. Estos autores afirman que la tolerancia cruzada debería aumentar la probabilidad de que las poblaciones de anfibios que son tolerantes a un insecticida puedan sobrevivir a exposiciones posteriores a otros insecticidas que tengan el mismo modo de acción. Por lo cual, si en el pasado algunas especies generaron tolerancia a cierto producto, esto puede facilitar su tolerancia a nuevos productos cuyo modo de acción sea similar.

Por otro lado, Ortiz y Egea (2013) reportaron que especies que habitan ambientes temporales, pueden mostrar mayor tolerancia a la contaminación debido a una mayor tolerancia genética a factores ambientales estresantes respecto de aquéllas que habitan ambientes más estables. Si bien en el presente trabajo se muestrearon cuerpos de agua permanentes, hubo algunos que para el segundo muestreo se hallaban prácticamente secos, lo que podría indicar que en algún momento esos charcos podrían secarse, fundamentalmente por las condiciones de sequía y uso. Ortiz y Egea (2013) afirman además, que la exposición a diferentes historias de contaminación puede hacer que determinadas poblaciones sean más tolerantes que otras, pudiendo darse casos de adaptación local a la contaminación. En esta línea sería interesante contrastar los resultados aquí obtenidos con los datos de usos históricos de la cuenca.

Los resultados parecen indicar que existe una asociación negativa entre la presencia de Clorpirifos y los anfibios (afectando la diversidad tanto de adultos como de larvas). Sin embargo, la mayor diversidad de anfibios se registró en diciembre y Clorpirifos solo en marzo, lo que sugiere la necesidad de investigar sobre los desfases temporales entre aplicaciones, tasas de exportación y de retención y sus efectos sobre los anfibios.

Existen numerosos trabajos que reportan efectos negativos del Clorpirifos sobre anfibios (e.g. Bernabo et al., 2011a; Bernabo et al., 2011b; Wijesinghe y Bandara, 2011; Bandara et al., 2012; Attademo et al., 2015; Huespe, 2015). En la región (Santa Fé, Argentina), Lajmanovich y colaboradores (2015) demostraron que la exposición de *Rhinella arenarum* (especie registrada en este trabajo) por vía cutánea a Clorpirifos y Glifosato indujo neurotoxicidad, estrés oxidativo y depresión inmunológica (i.e. tuvieron efectos metabólicos

importantes). En la misma línea, se encontró que Clorpirifos en niveles subletales causa alteraciones del desarrollo en la gástrula de *R. arenarum* (Sotomayor et al., 2015), y que a medida que aumenta la duración de la exposición y el desarrollo embrionario progresa, los valores de la concentración letal media disminuyen y el porcentaje de embriones malformados aumenta, a la vez que se observan detenciones de desarrollo y se registran alteraciones morfológicas (Sotomayor et al., 2012).

En otra línea, el uso del suelo aparenta tener un efecto sobre la morfología de las larvas de *H. pulchellus* (tanto sobre la altura del músculo de la cola como sobre la forma corporal), incidiendo sobre el efecto que ciertos fitosanitarios provocan en ellas (efectos diferenciales por uso del suelo de AMPA y Glifosato). Las larvas de *H. pulchellus* por lo tanto, exhiben diferencias en relación a las variables morfológicas analizadas, que podrían atribuirse al fenómeno de plasticidad fenotípica. A este respecto, deberían conducirse nuevos estudios a fin de comprobar si efectivamente esta respuesta plástica se relaciona con la presencia de fitosanitarios. Este aspecto es importante ya que la plasticidad fenotípica puede conducir a la asimilación genética que puede influir en las respuestas evolutivas de las poblaciones y, en el caso de los productos fitosanitarios, inducir tolerancias (Hua et al., 2015).

Como ya se mencionara, los resultados a este respecto solo son indicativos dada la cantidad y naturaleza de los datos. Al modelar, en todos los casos, es importante considerar las interacciones (Montgomery, 2008) entre los factores que se cree pueden estar condicionando las variables de respuesta. En los casos donde no corrió el modelo con la interacción, no es confiable el resultado aunque arroje un p-valor menor a 0.05. En los casos donde el modelo sí contempla la interacción y esta resultó ser significativa, no se puede decir que el fitosanitario o determinado uso tienen un efecto directo sobre la variable ya que para ello se debería analizar la interacción.

El estadio de desarrollo fue incluido como variable aleatoria a la hora de modelar el efecto sobre las variables morfológicas. Modelar con variables aleatorias dificulta las estimaciones (agrega numerosos parámetros a estimar) (West et al., 2007). Sin embargo, sabemos que el estadio de desarrollo condiciona la forma corporal (Carabio et al., 2017), por lo tanto es importante incluirlo como variable aleatoria en los análisis.

En cuanto a la modelación, no pudo emplearse una estrategia “Top-down” de construcción del modelo debido al gran número de variables explicativas a incluir y el tamaño del set de

datos. Los análisis aquí realizados respecto a la morfología de las larvas de *H. pulchellus* no consideraron los efectos combinados de los fitosanitarios, por lo tanto los mismos son incompletos y podríamos estar pasando por alto efectos combinados. Además, podrían estar ocurriendo otras interacciones que afecten a las poblaciones de anfibios: interacciones fitosanitario-variables ambientales o fitosanitarios-otros contaminantes antrópicos (Mann et al., 2009).

En la mayoría de los estudios que reportan efectos tóxicos de mezclas de compuestos es imposible dilucidar la toxicidad contributiva de los fitosanitarios individuales, si existe una interacción entre los diversos productos o el modo en que interaccionan (Mann et al., 2009; Brodeur, 2010; Sparling et al., 2014). A su vez, existen otros factores que podrían estar interactuando, cambiando el efecto que los fitosanitarios provocan en la biota. Entre estos factores se encuentran los fertilizantes nitrogenados, la radiación UV, la acidez, la temperatura y factores bióticos como la disponibilidad de alimento, la depredación la y competencia (Gilbert, 2001; Teplitsky et al., 2005; Relyea, 2006; Mann et al., 2009; Relyea, 2012). A este respecto, por ejemplo, Relyea (2003) reportó que en presencia de depredador el insecticida Carbaril resultó más tóxico en cierta especie que en experimentos sin depredador. Por lo tanto algunas de las consecuencias nocivas de los productos fitosanitarios sólo pueden ser evidentes cuando se combinan con otros factores de estrés, especialmente los naturales, como la depredación (Teplitsky et al., 2005). En adición, no debe pasarse por alto que existen diversos factores ambientales que han sido citados como determinantes de plasticidad fenotípica sobre variables morfológicas, por ejemplo la presencia de depredadores, la competencia y el hidroperíodo (e.g. Laurila y Kujasalo, 1999; Bridges, 2002; Relyea, 2002; Loman y Claesson, 2003; Relyea y Hoverman, 2003; Lind y Johansson, 2007; Jara, 2010). Esto hace que el estudio de este fenómeno en campo sea extremadamente complejo y deberían incluirse como variables en el estudio el mayor número de factores posibles.

Otro factor a tener en cuenta son los ingredientes “inertes” de los formulados comerciales. En este estudio se analizó la presencia de los componentes activos de los formulados comerciales (ej. Glifosato, Clorpirifos, Cipermetrina) y, en algunos casos de los productos de degradación de éstos (AMPA, o.p DDE y p.p. DDE). En ningún caso (y no es común que se haga) se incluyó en el análisis la detección de productos que forman parte del formulado comercial. Además de los ingredientes activos, los fitosanitarios utilizados en la producción

agrícola contienen a menudo varios aditivos, disolventes, vehículos, excipientes, estabilizantes y humectantes en la formulación (Mann et al., 2003). Existe vasta evidencia de que los formulados comerciales suelen ser más tóxicos que el ingrediente activo actuando solo (e.g. Mesnage et al., 2014; Defarge et al., 2016). En muchos casos las etiquetas no indican qué productos (fuera del compuesto activo) contiene el formulado (Brühl et al., 2013; Mann et al., 2003). Además, para poder buscar indicios de estos otros compuestos en los análisis deberían tenerse registros de qué formulados se están empleando en la zona y qué químicos contienen.

En línea con lo anterior, los surfactantes (uno de los aditivos más comunes usados para la formulación de fitosanitarios) son reconocidos como sustancias tóxicas para la fauna acuática, incluidos los anfibios. El surfactante incorporado en la mayoría de los productos a base de Glifosato (POEA) es altamente tóxico. Numerosos estudios apoyan que los formulados comerciales que contienen POEA son mucho más tóxicos que el Glifosato solo (Mann et al., 2009).

Finalmente, existen estudios que demuestran la importancia de considerar a los formulados comerciales por sobre los ingrediente activos. Por ejemplo, Mesnage y colaboradores (2014) encontraron que 8 de 9 formulaciones estudiadas (3 herbicidas, 3 insecticidas y 3 fungicidas) resultaron por encima de mil veces más tóxicas sobre células humanas que sus principios activos.

Por lo expuesto, es necesario para Uruguay avanzar en estudios más complejos sobre la interacción de las sustancias formuladas que se liberan al ambiente, entre ellas y con los distintos componentes de los agroecosistemas.

Perspectivas

Sobre la base de los resultados obtenidos, es posible considerar que existe un importante potencial para continuar modelando con mayor información de ingreso al SWAT (DEM de mayor resolución, clasificaciones de usos y tipos de suelo más afinadas y datos de clima reales), que permitirá mejorar la comprensión del transporte, dispersión y acumulación de productos fitosanitarios a escala de cuenca hidrográfica.

Resulta muy necesario contar con estudios sobre el comportamiento de los fitosanitarios en suelos de Uruguay (e.g. vida media), ya que la persistencia de determinados productos en el ambiente suele estar muy ligada a las características del suelo (e.g. porcentaje de arcillas totales y tipos de arcillas). Este tipo de trabajos ayudarían a entender, por ejemplo, qué concentraciones son elevadas para nuestro país en determinadas condiciones y durante cuánto tiempo posterior a su aplicación un determinado producto permanece en el sistema, con el potencial efecto tóxico que conlleva sobre la biota.

A su vez, el empleo masivo de Glifosato produce una fuerte presión de selección sobre las malezas, lo cual ha ocasionado problemas con la aparición de especies de malezas que presentan tolerancia y/o resistencia al mismo; existiendo evidencia de esto en países de la región (INIA, 2013). Hasta el momento, las estrategias utilizadas para poder controlar estas malezas son, para la gran mayoría de los productores, el aumento de las dosis de Glifosato o su combinación con otros ingredientes activos (Carrasco et al., 2012). A esto se suma el hecho de que el Glifosato (clasificado antiguamente como un fitosanitario de baja peligrosidad), a partir de marzo del 2015 se clasifica como un “probable carcinógeno para los seres humanos”, según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) de la OMS, luego de que varios estudios mostraran que es genotóxico (IARC, 2015; GRAIN, 2016). Esto refuerza la necesidad de generar más información a nivel local, incorporando además evaluaciones del factor biótico.

De acuerdo con lo discutido en la sección anterior, no es sencillo demostrar la afectación a nivel comunitario que los fitosanitarios pueden ejercer sobre los anfibios, dado los múltiples factores que deben tenerse en cuenta al momento de conducir estudios a campo. Resulta necesario profundizar en estudios de esta naturaleza, aumentando el número de muestreos y considerando el patrón de actividad temporal (horaria y estacional) de los anfibios.

Sería interesante además, incorporar otros factores a determinar. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunos podrían requerir de un mayor esfuerzo de muestreo y, muchas veces, de un análisis de laboratorio posterior. Por ejemplo, Brodeur (2010) comparó un índice de condición corporal de adultos entre sitios de cultivo y sitios sin cultivar (lo que implica la captura y medición de los individuos) y detectó la presencia de un patrón de alteraciones enzimáticas específico en adultos capturados en sitios cultivados.

Realizar estudios de acumulación (análisis de tejidos) en anfibios de nuestro país constituiría un gran avance, ya que permitiría conocer mejor la realidad de la contaminación con fitosanitarios en nuestros campos, y la posibilidad de contar con un indicador biológico de la calidad ambiental. Existen antecedentes de estudios en nuestro país que arrojaron resultados que reflejan la necesidad de más estudios al respecto. Por ejemplo, Ríos y colaboradores (2010) analizaron residuos de fitosanitarios en peces del Río Uruguay, y Carrasco-Letelier y colaboradores (2009) en abejas. Estos últimos encontraron que las dosis letales medias para el biotipo de abeja del Litoral Oeste de Uruguay a insecticidas fueron 3 veces más sensibles al Clorpirifos y 6 veces más sensible al Endosulfán (lo que significaría que a igual dosis, las abejas en Uruguay mueren antes). Esto demuestra que para analizar la toxicidad de los fitosanitarios sobre la biota, no es suficiente con los estudios internacionales, sino que se debería analizar a nivel nacional. Para el caso de los anfibios, no existen estudios en Uruguay que analicen fitosanitarios en tejido, así como tampoco existen análisis de toxicidad de los productos empleados en la agricultura actual sobre las diferentes especies que habitan nuestros campos (si bien los hay para algunas de las especies de la región en estudios conducidos en Argentina).

En adición, Sparling y colaboradores (2014) analizaron la presencia de residuos de fitosanitarios en suelo, agua y larvas de anfibios, encontrando Clorpirifos en agua y sedimento pero no en larvas, mientras que sí encontraron en larvas: Mirex, DDE, Endosulfán y Clordano, entre otros. Cada producto, debido a su naturaleza química y a las características del ambiente, se comporta diferente y es esperable encontrarlo en ciertos compartimientos ambientales. En el presente estudio se realizaron análisis en suelo, sin embargo podría haber compuestos que no se detectaron pero están presentes en otra matriz ambiental, o bien su concentración en suelo no represente una alarma y sí lo sea en otra matriz. Por lo tanto, se recomienda la determinación de fitosanitarios en más de una matriz (idealmente en agua, suelo y tejido) a la hora de realizar estudios de esta naturaleza, a fin de lograr una visión más completa del problema.

Además, en este trabajo se hallaron residuos de productos cuyo uso está prohibido en nuestro país. Sería interesante investigar la presencia de estos compuestos en el ambiente, intentando identificar si son residuos que se mantienen en el ambiente, con lo cual es necesario un sistema permanente de monitoreo para evaluar e implementar medidas de

mitigación. O por el contrario si se debe al uso ilegal de estos compuestos y por tanto resulta necesario implementar sistemas de control.

Por último, este es el primer trabajo para Uruguay en abordar la problemática de los productos fitosanitarios en el ambiente con un enfoque integral. Este tipo de enfoques presenta dificultades potenciadas, ya que a las dificultades de cada método específico se le suman las de los restantes métodos empleados y la de su integración. Esto podría verse como una desventaja en relación a los enfoques tradicionales. Sin embargo, son este tipo de aproximaciones las que permiten un acercamiento real al comportamiento e impacto que estos productos tienen sobre el ambiente.

Referencias

- Achaval F, Olmos A (2007) Anfibios y reptiles del Uruguay. 3ª Edición corregida y aumentada. Impreso y encuadernado en Zonalibro.
- Achkar M, Blum A, Bartesaghi L, Ceroni M (2012) Escenarios de cambio de uso del suelo en Uruguay. Informe Técnico. Convenio MGAP/PPR – Facultad de Ciencias/Vida Silvestre/ Sociedad Zoológica del Uruguay/CIEDUR. 24p.
- Acosta M (2013) Manejo integrado de cuencas: uso del suelo y repercusiones en la calidad del agua de la Cañada del Dragón en Montevideo rural. Tesis de maestría en Ciencias Ambientales, Universidad de la República, Uruguay.
- Agostini MG, Kacoliris F, Demetrio P, Natale GS, Bonetto C, Ronco AE (2013) Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems in northeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 104, 163-171.
- Alcalde L, Natale GS, Cajade R (2006) The tadpole of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leptodactylidae). *The Herpetological Journal*, 16(2), 203-211.
- American Veterinary Medical Association (AVMA) (2007) Guidelines on Euthanasia. Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia.
- AmphibiaWeb (2017) <<http://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 20 Mar 2017.
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Australian Ecology* 26, 32-46.
- Arbeletche P, Gutiérrez G (2010) Crecimiento de la agricultura en Uruguay: exclusión social o integración económica en redes. *PAMPA* 06, 113-138.
- Arnold JG, Moriasi DN, Gassman PW, Abbaspour KC, White MJ, Srinivasan R, Santhi C, Harmel RD, van Griensven A, Van Liew MW, Kannan N, Jha MK (2012) SWAT: model use, calibration, and validation. *American Society of Agricultural and Biological Engineers* 55, 1491-1508.
- Arnold JG, Srinivasan R, Muttiah RS, Williams JR (1998) Large area hydrologic modeling and assessment part I: model development. *Journal of the American Water Resources Association* 34, 73-89.
- Attademo A, Peltzer PM, Lajmanovich RC (2005) Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106, 389-394.
- Attademo AM, Peltzer PM, Lajmanovich RC, Cabagna-Zenkhusen M, Junges CM, Lorenzatti E, Aró C, Grenón P (2015) Biochemical changes in certain enzymes of *Lysapsus limellium* (Anura: Hylidae) exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113, 287-294.
- Baeza S, Gallego F, Lezama F, Altesor A, Paruelo J (2011) Cartografía de los pastizales naturales en las regiones geomorfológicas de Uruguay. 2, 33-54. En: Bases ecológicas y tecnológicas para el manejo de pastizales. FPTA N°26, INIA.

- Bailey GW, White JL (1970) Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil. *Residue Reviews* 32, 39-92
- Bandara MGDK, Wijesinghe MR, Ratnasooriya WD, Priyani AAH (2012) Chlorpyrifos-induced histopathological alterations in *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799) tadpoles: evidence from empirical trials. *Journal of Tropical Forestry and Environment* 2(2), 27-36.
- Bannwarth MA, Sangchan W, Hugenschmidt C, Lamers M, Ingwersen J, Ziegler AD, Streck T (2014) Pesticide transport simulation in a tropical catchment by SWAT. *Environmental Pollution* 191, 70-79.
- Bardier C, Canavero A, Maneyro R (2014) Temporal and Spatial Activity Patterns of Three Species in the *Leptodactylus fuscus* Group (Amphibia, Leptodactylidae). *South American Journal of Herpetology* 9(2), 106-113.
- Barra R, Colombo JC, Eguren G, Gamboa N, Jardim WF, Mendoza G (2005) Persistent Organic Pollutants (POPs) in Eastern and Western South American Countries. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 185, 1-33.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2006) Ecology. From individuals to Ecosystems. 4th Ed. Blackwell. Oxford.
- Bernabo I, Gallo L, Sperone E, Tripepi S, Brunelli E (2011b) Survival, development, and gonadal differentiation in *Rana dalmatina* chronically exposed to Chlorpyrifos. *Journal of Experimental Zoology* 315, 314-327.
- Bernabo I, Sperone E, Tripepi S, Brunelli E (2011a) Toxicity of Chlorpyrifos to larval *Rana dalmatina*: acute and chronic effects on survival, development, growth and gill apparatus. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 61, 704-718.
- Bionda C, di Tada IE, Lajmanovich RC (2011) Composition of amphibian assemblages in agroecosystems from the central region of Argentina. *Russian Journal of Herpetology* 18(2), 93-98.
- Blaustein AR, Johnson PTJ (2003) The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1(2), 87-94.
- Boivin A, Cherrier R, Schiavon M (2005) A comparison of five pesticides adsorption and desorption processes in thirteen contrasting field soils. *Chemosphere* 61, 668-676.
- Bolzan AMR, Saccol SA, Santos TGD (2016) Composition and diversity of anurans in the largest conservation unit in Pampa biome, Brazil. *Biota Neotropica* 16(2).
- Boquimpani-Freitas L, Marra RV, Van Sluys M, Rocha CFD (2007) Temporal niche of acoustic activity in anurans: interspecific and seasonal variation in a neotropical assemblage from south-eastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 28(2), 269-276.
- Borah DK, Bera M (2004) Watershed-scale hydrologic and nonpoint-source pollution models: review of applications. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 47, 789-803.
- Borteiro C, Kolenc M (2007) Redescription of the tadpoles of three species of frogs from Uruguay (Amphibia: Anura: Leiperidae and Leptodactylidae), with notes on natural history. *Zootaxa*, 1638, 1-20.

- Bozzo A, Corujo A (2010) Diagnóstico ambiental sobre el manejo de fitosanitarios en el cultivo de cebolla en el departamento de Salto-Uruguay.
- Bridges CM (2002) Tadpoles balance foraging and predator avoidance: effects of predation, pond drying, and hunger. *Journal of Herpetology* 36, 627-634.
- Brodeur JC (2010) La soja y sus agroquímicos: evaluando impactos en anfibios. En Aspectos ambientales del uso de Glifosato. Estación Experimental Agropecuaria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. Editoras: Camino M, Aparicio V.
- Brühl CA, Pieper S, Weber B (2011) Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stage to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(11), 2465-2472.
- Brühl CA, Schmidt T, Pieper S, Alscher A (2013) Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? *Scientific Reports* 3, 1135; DOI:10.1038/srep01135.
- Brum FT, Gonçalves LO, Cappelatti L, Carlucci MB, Debastiani VJ, Salengue EV, dos Santos GD, Both C, Bernardo-Silva JS, Dias R, da Silva L (2013) Land use explains the distribution of threatened new world amphibians better than climate. *PloS one*, 8(4), e60742.
- Buskirk JV (2009) Natural variation in morphology of larval amphibians: Phenotypic plasticity in nature? *Ecological Monographs* 79(4), 681-705.
- Camargo A, Naya DE, Canavero A, da Rosa I, Maneyro R (2005) Seasonal activity and the body size-fecundity relationship in a population of *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Anura, Leptodactylidae) from Uruguay. *Annales Zoologici Fennici* 42, 513-521.
- Canavero A, Arim M, Naya DE, Camargo A, da Rosa I, Maneyro R (2008) Calling activity patterns in anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants. *North-Western Journal of Zoology* 4(1), 29-41.
- Canavero A, Brazeiro A, Camargo A, da Rosa I, Maneyro R, Núñez D (2010) Amphibian diversity of Uruguay: Background knowledge, inventory completeness and sampling coverage. *Boletín de la Sociedad Zoológica de Uruguay* 19, 2-19.
- Cantou G, Roel A, Carlomagno M, González-Sapienza G (2009) Disipación de los herbicidas clomazone y quinclorac en arroz bajo dos tratamientos de riego.
- Carabio M, Perazza G, Larrañaga F, Naya D (2017) The effect of food availability on phenotypic plasticity and phenotypic integration in the hylid frog *Hypsiboas pulchellus*. *Evolutionary Ecology Research* 18, 281-291.
- Carrasco AE, Sánchez NE, Tamagno LE (2012) Modelo agrícola e impacto socio-ambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios. Comité de Medio Ambiente de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM). Serie Monográfica Sociedad y Ambiente: Reflexiones para una nueva América Latina. ISSN 2314-1743, Monografía N°1.

- Carrasco-Letelier L, Ojeda P, Ramallo G, Díaz S, Mendoza Y (2009) Toxicidad aguda de abejas expuestas a insecticidas empleados en cultivos agrícolas del litoral oeste. Sociedad de bioquímica y biología molecular, Montevideo, Uruguay, p.84.
- Carreira S, Maneyro R (2015) Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la herpetofauna de Uruguay sobre la base de los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo.
- Casabé N, Piola L, Fuchs J, Oneto ML, Pamparato L, Basack S, Giménez R, Massaro R, Papa JC, Kesten E (2007) Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments* 7(4), 232-239.
- Chuvieco E (2008) Teledetección ambiental: La observación de la Tierra desde el Espacio. Ed. Ariel. Barcelona. 594 pp.
- Colombo JC, Cappelletti N, Williamson M, Migoya MC, Speranza E, Sericano J, Muir DCG (2011) Risk ranking of multiple-POPs in detritivorous fish from the Río de la Plata. *Chemosphere* 83:882–889.
- CONICET (2009) Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Buenos Aires, 133 pp.
- Cortés-Gómez AM, Ramírez-Pinilla MP, Urbina-Cardona N (2015) Protocolo para la medición de rasgos funcionales en anfibios. En: La Ecología Funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: protocolos y aplicaciones. Ed: Salgado-Negret B. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C. Colombia. 236 pp.
- Cothran RD, Brown JM, Relyea RA (2013) Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. *Evolutionary Applications*, ISSN 1752-4571. doi:10.1111/eva.12069
- Davidson C (2004) Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecological Applications* 14, 1892–1902.
- Davidson C, Knapp RA (2007) Multiple stressors and amphibian declines: Dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs. *Ecological Applications* 17:587–597.
- De Cáceres, Legendre P, Moretti M (2010) Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos* 119(10),1674-1684.
- de Cerqueira Rossa-Feres D, Nomura F (2006) Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil1. *Biota Neotropica* 6(1).
- De Lange HJ, Lahr J, Van der Pol JJC, Wessels Y, Faber JH (2009) Ecological vulnerability in wildlife: An expert judgement and multicriteria analysis tool using ecological traits to assess relative impact of pollutants. *Environmental Toxicology Chemistry* 28:2233–2240.
- de Sá RO, Lavilla EO (1997) The tadpole of *Pseudis minuta* (Anura: Pseudidae), an apparent case of heterochrony. *Amphibia-Reptilia* 18(3), 229-240.

- Defarge N, Takács E, Lozano VL, Mesnage R, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE, Székács A (2016) Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *International journal of environmental research and public health* 13(3), 264.
- Dimond JB, Owen RB (1996) Long-term residue of DDT compounds in forest soils in Maine. *Environmental Pollution* 92(2), 227-230.
- Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) (2012) Encuesta Agrícola "Invierno 2012". En: www.mgap.gub.uy
- Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA) (2009) Informe Nacional del Estado del Ambiente / Uruguay 2009. Capítulo 8. En: www.mvotma.gub.uy
- Durán A (1998) Contenido y distribución geográfica de carbono orgánico en suelos del Uruguay. *Agrociencia* 2, 37-47.
- Durán A, Calífra A, Molfino JH (1999) Suelos del Uruguay según Soil Taxonomy http://cebra.com.uy/renare/media/Suelos_del_Uruguay_según_Soil_TaxTaxon.PDF
- Echeverría DD, Fiorito de Lopez LE, Vaccaro OM, Filipello AM (1987) Consideraciones acerca de las formulas dentarias de las larvas de Bufo arenarum henser (Anura: Bufonidae). *Cuadernos de herpetología, Asociación herpetológica Argentina* 3(3), 33-39
- Eguren G, García C, Rivas-Rivera N, Bandeira S, Vidal N, Moura M, Teixeira de Mello F, Böcking B (2008) Gestión ambiental de cuencas de uso agropecuario. *Revista Arroz* N° 55:10-20.
- ESRI (2011) ArcGIS® Desktop: Release 10. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute.
- FAO (2011) The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW). Managing systems at risk. London, food and agriculture organization of the United Nations, Rome and Earthscan.
- FAO (2015) Atlas de cobertura del suelo de Uruguay. Cobertura de suelo y cambios 2000-2011.
- Francesconi W, Srinivasan R, Pérez-Miñana E, Willcock SP, Quintero M (2016) Using the Soil and Water Assessment Tool (SWAT) to model ecosystem services: A systematic review. *Journal of Hydrology* 535, 625-636.
- García-Préchac F, Ernst O, Arbeletche P, Pérez-Bidegain M, Pritsch C, Ferenczi A, Rivas M (2010) Intensificación Agrícola: oportunidades y amenazas para un país productivo y natural. Uruguay, Fondo universitario para contribuir a la comprensión pública de temas de interés general, Colección Art. 2 CSIC.
- Gavrilescu M (2005) Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences* 5(6), 497.
- Getis A, Ord JK (1992) The analysis of spatial association by use of distance statistics. *Geographical Analysis* 24(3), 189-206.
- Gevao B, Semple KT, Jones KC (2000) Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution* 108, 3-14.

- Gilbert SF (2001) Ecological developmental biology: developmental biology meets the real world. *Developmental Biology* 233, 1-12.
- Girvetz EH, Maurer EP, Duffy P, Ruesch A, Thrasher B, Zganjar C (2013) Making Climate Data Relevant to Decision Making: The important details of Spatial and Temporal Downscaling. *The World Bank* 43 pp.
- Gomes dos Santos T, Rossa-Feres D (2007) Similarities in calling site and advertisement call among anuran amphibians in southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology* 2(1), 17-30.
- Gosner KL (1960) A simplified table for stating anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16, 183-190.
- GRAIN (2016) Noticias del veneno conocido como Glifosato. *Biodiversidad* 89 / 2016-3
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1):9 pp.
- Heyer WR, Maureen AD, McDiarmid WR, Hayek LC, Foster MS (1994) Medición y monitoreo de la diversidad biológica. Métodos estandarizados para anfibios. Smithsonian Institution Press.
- Hill M, Clérici C (2008) FPTA 171: Residualidad de agroquímicos en arroz. *Revista Arroz* N° 54:22-28.
- Holvoet K, Seuntjens P, Vanrolleghem P (2007) Monitoring and modeling pesticide fate in surface waters at the catchment scale. *Ecological Modelling* 209, 53-64.
- Holvoet K, van Griensven, Seuntjens P, Vanrolleghem PA (2005). Sensitivity analysis for hydrology and pesticide supply towards the river in SWAT. *Physics and Chemistry of the Earth* 30, 518-526.
- Hua J, Cothran R, Stoler A, Relyea R (2013b) Cross-tolerance in amphibians: wood frog mortality when exposed to three insecticides with a common mode of action. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(4), 932-936.
- Hua J, Jones DK, Mattes BM, Cothran RD, Relyea RA, Hoverman JT (2015) The contribution of phenotypic plasticity to the evolution of insecticide tolerance in amphibian populations. *Evolutionary Applications* ISSN 1752-4571.
- Hua J, Morehouse NI, Relyea R (2013a) Pesticide tolerance in amphibians: induced tolerance in susceptible populations, constitutive tolerance in tolerant populations. *Evolutionary Applications* 6, 1028-1040. ISSN 1752-4571.
- Hubálek Z (1982) Coefficients of association and similarity, based on binary (presence-absence) data: an evaluation. *Biological Reviews* 57, 669-689.
- Huespe, I (2015) Toxicidad genética y hepática provocada por cultivos de arroz en anfibios anuros adultos. XIX Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- INIA (2013) Variabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables. Serie Técnica N°204. Ed: Ríos A.
- Instituto Nacional De Pesquisas Espaciais (INPE). Ministério da Ciência, Tecnologia e inovação. <http://www.inpe.br/>

- Intendencia de Canelones. Convenio de cooperación Intendencia y MVOTMA. Junio de 2016.
<https://www.imcanelones.gub.uy/noticias/convenio-de-cooperacion-intendencia-y-mvotma>
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2015) Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. IARC Monographs, Volume 112
- Jara FG (2010) Plasticidad fenotípica en anuros patagónicos de los géneros *Pleurodema* y *Rhinella*: respuestas al hidroperíodo y a los depredadores. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Comahue, Bariloche, Argentina.
- Jensen J (2007) Remote Sensing of the Environment: An Earth Resource Perspective. Ed. Upper Saddle River-Prentice Hall. New Jersey. 592pp.
- Knutson M, Richardson W, Reineke D, Gray B, Parmelee J, Weick S (2004). Agricultural ponds support amphibian populations. *Ecological Applications* 14, 669–684.
- Kolenc F, Borteiro C, Alcalde L, Baldo D, Cardozo D, Faivovich J (2008) Comparative larval morphology of eight species of *Hypsiboas* Wagler (Amphibia, Anura, Hylidae) from Argentina and Uruguay, with a review of the larvae of this genus. *Zootaxa* (1927), 1.
- Koumaris A, Fahrig L (2016) Different anuran species show different relationships to agricultural intensity. Society of Wetland Scientists. DOI 10.1007/s13157-016-0781-4.
- Lajmanovich R, Attademo A, Peltzer P, Junges C (2009) Inhibition and recovery of brain and tail cholinesterases of *Odontophrynus americanus* tadpoles (Amphibia: Cycloramphidae) exposed to fenitrothion. *Journal of Environmental Biology* 30(5), 923-926.
- Lajmanovich R, Attademo A, Peltzer P, Junges C, Cabagna M (2011) Toxicity of four herbicide formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 681-689.
- Lajmanovich R, Attademo A, Simoniello M, Poletta G, Junges C, Peltzer P, Grenón P, Cabagna-Zenklusen M (2015) Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2,4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water Air Soil Pollut* 226-427
- Lajmanovich R, Peltzer P, Attademo A, Cabagna-Zenklusen M, Junges C (2012) Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Química Viva* 3(11), 184-198.
- Langone JA (1989) Descripción de la larva de *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo* 12, 1–11
- Langone JA, de Sá RO (2005) Redescrípción de la morfología larval externa de dos especies del grupo de *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae). *Phyllomedusa* 4(1), 49.
- Larose M, Heathman GC, Norton LD, Engel B (2007) Hydrologic and atrazine simulation of the Cedar Creek Watershed using the SWAT model. *Journal of Environmental Quality* 36, 521e531.

- Laufer G, Barreneche JM (2008) Re-description of the tadpole of *Pseudopaludicola falcipes* (Anura: Leiuperidae), with comments on larval diversity of the genus. *Zootaxa* 1760, 50-58.
- Laurila A, Kujasalo J (1999) Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Journal of Animal Ecology* 68, 1123-1132.
- Legendre P, Legendre L (1998) Numerical Ecology. Volume 24, *Developments in Environmental Modelling*. Elsevier Science BV
- Leites Cartagena V (2009) Estudios de fauna íctica en salto grande. Comisión técnica mixta de salto grande. Jornadas de actualización, Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU).
- Leonard RA, Knisel WG, Still DA (1987) GLEAMS: Ground water loading effects on agricultural management systems. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 30, 1403-1428.
- Lescano CI, Sotomayor V, Ferrari A, Venturino A (2009) Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta Toxicología Argentina* 17(1): 8-19.
- Ley Nº 16.170 de 1991: Faculta al Poder Ejecutivo a prohibir la utilización, venta y exportación de vegetales, productos o subproductos de origen vegetal contaminados con residuos de plaguicidas en niveles superiores a los establecidos en el Codex Alimentarius o por los requerimientos, en la materia, del país de destino. Resolución PE 825/992 de 15/10/992 delegó en el MGAP las atribuciones conferidas y por Resolución Ministerial de fecha 23/10/992 se subdelegó en el entonces Director de la DSPA (Actualmente DGSA).
- Likens GE (1992) The ecosystem approach: its use and abuse. Excellence in Ecology Vol. 3. Ecology Institute, Oldendorf-Luhe, Germany. 167 pp.
- Lind MI, Johansson F (2007) The degree of adaptative phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Journal of Evolutionary Biology* 20, 1288-1297.
- Lips KR (2016) Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 371: 20150465.
- Loman J, Claesson D (2003) Plastic response to pond drying in tadpoles *Rana temporaria*: test of cost models. *Evolutionary Ecology Research* 5, 179-194.
- Loyola R, Lemes P, Urbina-Cardona N, Baldo D, Lescano J, Nori J (2015) Amphibians in a changing world: a global look at their conservation status. *FrogLog* 23(4), 30-31.
- Luo Y, Zhang M (2009) Management-oriented sensitivity analysis for pesticide transport in watershed-scale water quality modeling using SWAT. *Environmental Pollution* 157, 3370-3378
- Mackay D (2001) Multimedia Environmental Models: The Fugacity Approach. Lewis Publishers.

- Maggioni T, Hued AC, Monferrán MV, Bonansea RI, Galanti LN, Amé MV (2012). Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution in the Middle-Lower Basin of the Suquía River (Córdoba, Argentina). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 63, 337-353.
- Mann RM, Bidwell JR, Tyler MJ, (2003) Toxicity of herbicide formulations to frogs and the implications for product registration: a case study from Western Australia. *Applied Herpetology* 1, 13–22.
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP (2009) Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157(11), 2903-2927.
- Manta E, Cancela H, Cristina J, García Préchac F (2013b) Informe de los decanos de las facultades de Química, Ingeniería, Ciencias y Agronomía al Concejo Directivo Central de La Universidad de La República sobre el agua de OSE. En: <http://portal.fagro.edu.uy>
- Manta E, Cancela H, Garcia-Préchac F (2013a) Informe sobre la calidad del agua en la cuenca del Río Santa Lucía: estado de situación y recomendaciones.
- Markert B, Breure T, Zechmeister H (2003). Bioindicators and biomonitors. Principles, concepts and applications. *Elsevier*.
- Merwade V, Rajib A (2014) Setting up a SWAT Model with ArcSWAT. School of Civil Engineering, Purdue University, USA.
- Mesnage R, Defarge N, de Vendomois JS, Séralini GE (2014) Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed* 2014, 8 pp.
- Miner BG, Sultan SE, Morgan SG, Padilla DK, Relyea RA (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 20(12), 685-692.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) (1994) Unidades de suelos Coneat. MGAPDGRNAR-CONEAT. Montevideo.
- Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA) (2013) Plan de acción para la protección del agua en la cuenca del Santa Lucía. En: www.mvotma.gub.uy
- Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B (2011) Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *International Journal of Environmental Research and public health* 8(6), 2265-2303.
- Montgomery DC (2008) Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley.
- Morell I, Candela, L (1998) Adsorción de herbicidas en suelos. Aplicación al estudio del comportamiento de Imazamethabenz-methyl en suelos de cultivo. *Plaguicidas. Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos* 33-46.
- Muñoz Quesada MT (2011) Aspectos bioéticos en el control y aplicación de plaguicidas en Chile. *Acta Bioethica* 17 (1), 95-104.
- Nardo D (2011) Estudio del impacto de plaguicidas utilizados en el cultivo de soja y en otras actividades agrícolas sobre las especies acuáticas de consumo humano en el área Protegida Laguna de Rocha.

Tesis de maestría en nutrición con énfasis en Salud pública. Universidad Católica, Montevideo, Uruguay.

NASA ASTER (2006) Advanced Spaceborne Thermal Emission and Reflection Radiometer. <http://asterweb.jpl.nasa.gov/>.

Naya DE (2010) La plasticidad fenotípica en el contexto actual de cambio global. En: Darwin en el Sur, ayer y hoy. (eds. Massarini A, Hasson E). Editorial Centro Cultural Ricardo Rojas, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Neitsch SL, Arnold JG, Kiniry JR, Williams JR (2009). Overview of Soil and Water Assessment Tool (SWAT) Model. In World Association of Soil and Water Conservation, Soil and Water Assessment Tool (SWAT): Global Applications, eds. Arnold J, Srinivasan R, Neitsch S, George S, Abbaspour K, Gassman P, Hao FH, van Griensven A, Gosain A, Debels P, Kim NW, Somura H, Ella V, Jintrawet A, Reyes M, Sombatpanit S, 3-23.

Neitsch SL, Arnold JG, Srinivasan R (2002). Pesticides fate and transport predicted by the Soil and Water Assessment Tool (SWAT). Atrazine, Metolachlor and Trifluralin in the Sugar Creek Watershed. Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency.

Nori J, Lemes P, Urbina-Cardona N, Baldo D, Lescano J, Loyola R (2015) Amphibian conservation, land-use changes and protected areas: A global overview. *Biological Conservation* 191, 367-374.

Nori J, Lescano J, Illordi-Rangel P, Frutos N, Cabrera M, Leynaud G (2013) The conflict between agricultural expansion and priority conservation areas: Making the right decisions before it is too late. *Biological Conservation* 159, 507-513.

Núñez S, Maeso D (2010a) Los plaguicidas y su potencial impacto ambiental. *Revista INIA Uruguay* 21, 36-40.

Núñez S, Maeso D (2010b) Los plaguicidas agrícolas y su potencial impacto ambiental. *Revista INIA Uruguay* 22, 35-40.

Ortiz-Hernández ML, Sánchez-Salinas E, Olvera-Velona A, Folch-Mallol JL (2011) Pesticides in the environment: impacts and their biodegradation as a strategy for residues treatment. Pesticides - formulations, effects, fate. *ISBN*, 978-953.

Ortiz-Santaliestra ME, Egea-Serrano A (2013) Análisis del impacto de la contaminación química sobre la herpetofauna: nuevos desafíos y aplicaciones prácticas. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 24(1), 2-34.

Peltzer P, Lajmanovich R (2007) Amphibians. In *The Middle Paraná River* (pp. 327-340). Springer Berlin Heidelberg.

Peltzer P, Lajmanovich R, Sánchez L, Attademo A, Junges C, Bionda C, Martino A, Basso A (2011) Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. *Herpetological Conservation and Biology* 6(3): 432-442.

- Peltzer P, Lajmanovich R, Sánchez-Hernandez J, Cabagna M, Attademo A, Basso A (2008) Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 185-197.
- Peltzer, P. M.; Lajmanovich, R. C.; Attademo, A. M. y Beltzer, A. H. (2006). Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. *Biodiversity and Conservation* 15, 3499-3513.
- Perazza G (2013) Evaluación de plasticidad fenotípica en larvas de *Hypsiboas pulchellus* en la localidad de Barra Grande, Rocha. Tesina de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Agronomía - Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. 48pp.
- Piñeiro G, Perelman S, Guerschman JP, Paruelo JM (2008) How to evaluate models: observed vs. predicted or predicted vs. observed? *Ecological modelling* 216, 316-322.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Ramanarayanan T, Narasimhan B, Srinivasan R (2005) Characterization of fate and transport of isoxaflutole, a soil-applied corn herbicide, in surface water using a watershed model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8848-8858.
- Redo DJ, Aide TM, Clark ML, Andrade-Núñez MJ (2012) Impacts of internal and external policies on land change in Uruguay, 2001-2009. *Environmental Conservation* 39(2), 122-131.
- Relyea R (2000) Trait-mediated indirect effects in larval anurans: reversing competition with the threat of predation. *Ecology* 81(8), 2278-2289.
- Relyea R (2002) Competitor-induced plasticity in tadpoles: consequences, cues, and connections to predator induced plasticity. *Ecological Monographs*, 72, 523-540.
- Relyea R (2003) Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. *Ecological Applications* 13, 1515–1521.
- Relyea R (2004a) Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1737–1742.
- Relyea R (2004b) Fine-tuned phenotypes: tadpole plasticity under 16 combinations of predators and competitors. *Ecology*, 85(1), 172-179.
- Relyea R (2005) The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15, 618–627.
- Relyea R (2006) The effects of pesticides, pH, and predatory stress on amphibians under mesocosm conditions. *Ecotoxicology* 15(6), 503-511.
- Relyea R (2009) A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159, 363-376.
- Relyea R (2012) New effects of Roundup on amphibians: predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecological Applications* 22(2), 634-647.

- Relyea R, Hoverman J (2003) The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile tree frogs. *Oecologia*, 134, 596-604.
- Relyea R, Schoeppner N, Hoverman J (2005) Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications* 15(4), 1125-1134.
- Resolución MGAP del 14/5/2004: Restricciones a la aplicación de productos fitosanitarios en zonas urbanas, suburbanas y centros poblados.
- Resolución MGAP Nº 129 del 27 de febrero de 2008: Prohíbe la aplicación de productos fitosanitarios a una distancia inferior a 30 metros de corrientes naturales de agua o fuentes superficiales de agua para aplicación aérea y 10 metros para aplicación terrestre mecanizada. Prohíbe el llenado con agua de la maquinaria de aplicación directo desde dichas corrientes o fuentes.
- Resolución MGAP Nº 188 del 25 de marzo de 2011: Prohíbe la aplicación aérea de productos fitosanitarios en todo tipo de cultivo, a una distancia inferior a 500 metros del límite del predio de centros educativos y las aplicaciones terrestres mecanizadas a una distancia inferior a 300 metros del límite del predio de centros educativos.
- Ríos M, Zaldúa N, Cupeiro S (2010) Evaluación participativa de plaguicidas en el sitio RAMSAR, Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. Vida Silvestre Uruguay.
- Rohlf FJ (2015) ptsDig2, version 2.19. *Ecology & Evolution*, SUNY at Stony Brook.
- Saavedra C (2010) Un Siglo de Agricultura. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, MGAP. En: www.mgap.gub.uy
- Savage JM, Cei JM (1965) A review of the leptodactylid frog genus, *Odontophrynus*. *Herpetologica* 21(3), 178-195.
- Sawchik J, Pérez Bidegain M (2012) Estudio del efecto ambiental de los agroquímicos en los sistemas de producción agrícolas en el litoral oeste de Uruguay. Informe final del proyecto. Fondo de promoción de tecnología agropecuaria. 30pp.
- Servicio Geográfico Militar (SGM) (1987) Cartas topográficas digitales E=1: 50.000. Uruguay.
- Soil and Water Assessment Tool (SWAT). Sitio web del proyecto. <http://swat.tamu.edu/software/arcswat/>
- Sotomayor V, Chiriotto TS, Pechenv AM, Venturino A (2015) Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 119, 48-53.
- Sotomayor V, Lascano C, Pechen AM, Venturino A (2012) Developmental and polyamine metabolism alterations in *Rhinella arenarum* embryos exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 7pp.
- Souto G (2005) Los rasgos de la agricultura de secano en Uruguay. El camino recorrido hasta el actual auge de la actividad. Sus posibilidades futuras. En: www.inia.org.uy

- Soutullo A, Clavijo , Martínez-Lanfranco JA (2013) Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/MEC, Montevideo. 222 pp.
- Sparling DW, Bickham J, Cowman D, Fellers GM, Lacher T, Matson CW, McConnell L (2014) In situ effects of pesticides on amphibians in the Sierra Nevada. *Ecotoxicology*. DOI 10.1007/s10646-014-1375-7.
- Stebniki S, González I, D'Anatro A, Teixeira de Mello F (2016) Relaciones entre variables ambientales y la comunidad de peces del río Uruguay bajo (Uruguay). *Aqua-LAC* 8(1), 62-67.
- Stockholm Convention. Protecting human health and the environment from persistent organic pollutants. <http://chm.pops.int/>
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues AS, Fischman DL, Waller RL (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783–1786.
- Taylor B, Skelly D, Demarchis L, Slade MD, Galusha D, Rabinowitz PM (2005) Proximity to Pollution Sources and Risk of Amphibian Limb Malformation. *Environmental Health Perspectives* 113(11), 1498-1501.
- Teplitsky C, Piha H, Laurila A, Merila J (2005) Common pesticide increases costs of antipredator defenses in *Rana temporaria* tadpoles. *Environmental Science and Technology* 39, 6079-6085.
- Terra J, García Préchac F (1998) Uso de tecnología de siembra directa en renovación de pasturas degradadas con gramilla (*cynodon dactylon*). In: INIA Treinta y Tres. Jornada anual de producción animal. Resultados Experimentales 1997-1998. Treinta y Tres: INIA. p. 67-76. (Serie Actividades de Difusión 172)
- Terra Natero A (2016) Y después del boom agrícola ¿Qué?. *Plan Agropecuario* 157, 62-64.
- Teixeira de Mello F (2007) Efecto del uso del suelo sobre la calidad del agua y las comunidades de peces en sistemas lóticos de la cuenca baja del río Santa Lucía (Uruguay). Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. 58pp
- Thrasher B, Maurer EP, McKellar C, Duffy PB (2012) Technical Note: Bias correcting climate model simulated daily temperature extremes with quantile mapping. *Hydrology and Earth Systems Science* 16, 3309–3314.
- Tiscornia G, Achkar M, Brazeiro A (2014) Efectos de la intensificación agrícola sobre la estructura y diversidad del paisaje en la región sojera de Uruguay. *Ecología Austral* 24: 212-219.
- van der Werf HM (1996) Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 60(2-3), 81-96.
- van Meter RJ, Glinski DA, Hong T, Cyterski M, Henderson WH, Purucker ST (2014) Estimating terrestrial amphibian pesticide body burden through dermal exposure. *Environmental Pollution* 193, 262-268.
- Wake DB, Vredenburg VT (2008) Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(1), 11466-11473.
- Watts M (2012) Chlorpyrifos as a possible global POP. Pesticide Action Network North America. 34pp.

- Welsh HH, Ollivier LM (1998) Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's redwoods. *Ecological Applications* 8, 1118–1132.
- West BT, Welch KB, Galecki AT (2007) Linear mixed models: A practical guide using statistical software. CRC Press. 349 pp.
- Whitman WD, Agrawal AA (2009) What is phenotypic plasticity and why is it important? En: Phenotypic plasticity of insects (Whitman DW, Ananthakrishnan TN). Pp 1-47. Science Publishers, Enfield.
- Wijesinghe MR, Bandara MGDK (2011) Chlorpyrifos-induced toxicity in *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799) larvae. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 60, 690-696.
- Winchell M, Srinivasan R, Di Luzio M, Arnold J (2007) ArcSWAT Interface for SWAT2005 User's Guide. Texas Agricultural Experiment Station and United States Department of Agriculture, Temple, TX.
- Winchell M, Srinivasan R, Di Luzio M, Arnold J (2013) ArcSWAT Interface for SWAT2012. User's Guide. Descargado del sitio web del proyecto SWAT.
- Ziegler L, Maneyro R (2008) Clave para la identificación de los anfibios de Uruguay:(chordata: amphibia). Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología, Sección Zoología Vertebrados.

Anexo I – Lista de especies de anfibios citadas para la región (departamentos de San José, Florida y Canelones). Se indica que especies sería esperable encontrar en la cuenca del Arroyo de La Virgen, según bibliografía y consulta a expertos (3). En negrita se resaltan las especies que efectivamente fueron registradas.

	Esperaría registrarla		Comentarios
	SI	NO	
<i>Chthonerpeton indistinctum</i>		x	
<i>Argenteohyla siemersi</i>		x	
<i>Dendropsophus samborni</i>	x		
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	x		
<i>Phyllomedusa iheringii</i>		x	
<i>Pseudis minutus</i>	x		
<i>Scinax berthae</i>	x		pocos registros en gral. / rep. explosiva
<i>Scinax fuscovarius</i>		x	
<i>Scinax granulatus</i>	x		
<i>Scinax squalirostris</i>	x		estrechamente asociada a caraguatás
<i>Certophrys ornata</i>		x	
<i>Leptodactylus gracilis</i>	x		
<i>Leptodactylus latinasus</i>	x		
<i>Leptodactylus mystacinus</i>	x		poco común, baja abundancia
<i>Leptodactylus latrans</i>	x		
<i>Limnomedusa macroglossa</i>		x	
<i>Odontophrynus americanus</i>	x		rep. explosiva luego de lluvias
<i>Physalaemus biligonigerus</i>		x	
<i>Physalaemus fernandezae</i>		x	
<i>Physalaemus gracilis</i>	x		
<i>Physalaemus henselii</i>		x	
<i>Physalaemus riograndensis</i>		x	
<i>Pleurodema bibroni</i>		x	
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	x		
<i>Rhinella arenarum</i>	x		si no está vocalizando no se ve
<i>Rhinella granulosus</i>	x		si no está vocalizando no se ve
<i>Melanophryniscus montevidensis</i>		x	
<i>Melanophryniscus sanmartini</i>		x	
<i>Elachistocleis bicolor</i>	x		rep. explosiva luego de lluvias
<i>Lithobates catesbeianus</i>		x	

**Rhinella granulosus* engloba *R. dorbignyi* y *R. fernandezae*

Achaval F, Olmos A (2007) Anfibios y reptiles del Uruguay. 3ª Edición corregida y aumentada. Impreso y encuadernado en Zonalibro.

- Kolenc F, Borteiro C, Baldo D, Ferraro D, Prigioni C (2009) The tadpoles and advertisement calls of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Muller), with notes on their geographic distribution and conservation status (Amphibia, Anura, Leuperidae). *Zootaxa* 1969, 1-35.
- Langone J (1999) Anfibios de Aguas Corrientes, departamento de Canelones, Uruguay (Amphibia). *Relevamientos de Biodiversidad* 4, 1-6.
- Núñez D, Maneyro R, Langone J, de Sá RO (2004) Distribución geográfica de la fauna de anfibios del Uruguay. *Smithsonian Herpetological Information Service* 134, 36pp.

Anexo II – Fichas de los fitosanitarios incluidos en la modelación.

Glifosato

Es un herbicida genérico no selectivo, actualmente el de uso más extendido en la agricultura (IARC, 2015). En nuestro país se emplea Glifosato de diferentes orígenes: Roundup® (formulado original, producido por la multinacional Monsanto), formulado nacional (laboratorio Tampa) y chinos e indios. Estos últimos son muy baratos y muy malos (ambientalmente) (Rodríguez Lagreca comunicación personal).

Roundup® contiene un surfactante denominado POEA (polioxietilamina) que facilita la acción del Glifosato y que torna a la formulación mucho más tóxica que el Glifosato puro. Además, el principal metabolito en la degradación del Glifosato en ambientes terrestres es el ácido aminometilfosfónico (AMPA), que también es tóxico (Carrasco et al., 2012).

En la evaluación de la adsorción y desorción del Glifosato se encontró que esta está muy asociada al contenido y el tipo de arcillas de los suelos, que se adsorbe fuertemente a estos materiales, pero que este proceso es reversible y que el Glifosato nuevamente puede quedar disponible en el suelo (Bustos, 2012).

A nivel mundial, existen alrededor de 400 citas de trabajos científicos sobre la toxicidad del Glifosato en distintos modelos animales (de laboratorio y de vida silvestre). En lo referido a anfibios, Relyea (2005), por ejemplo, documentó que el Roundup® es letal para las larvas, matando más del 90% de larvas que fueron expuestas a pequeñas dosis del surfactante POEA. Sobre efectos en especies locales (Argentina), se destaca el trabajo de Lajmanovich y colaboradores (2012) que describe malformaciones morfológicas externas, además de efectos sobre el esqueleto hiobranquial (alteraciones en la estructura cartilaginosa por disrupción en la formación de colágeno) en renacuajos de una especie de rana ampliamente distribuida en la Argentina expuesta a dosis sub-letales de Glifosato.

Clorpirifos

Es un compuesto organofosforado que se utiliza como insecticida y acaricida, actuando sobre los organismos por contacto, ingestión y/o inhalación. Su principal modo de acción es la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa, produciendo efectos neurotóxicos, ya que la acetilcolina, al no ser degradada, se acumula en exceso en la sinapsis.

Se ha utilizado desde 1965 tanto en zonas agrícolas como no agrícolas. En USA el mayor mercado agrícola de Clorpirifos es el cultivo de maíz, empleándose también en soja, árboles frutales y hortalizas. Los usos no agrícolas incluyen campos de golf, césped de jardines particulares y parques, entre otros. También se emplea como un adulticida de mosquito, y como cebo para cucarachas y hormigas (EPA, 2016).

Se ha reportado un amplio rango de vidas medias de Clorpirifos para persistencia en suelo, que va de unos pocos días hasta 4 años, dependiendo de la tasa de aplicación, el tipo de ecosistema y de factores ambientales varios (Watts, 2012).

Existen distintos formulados comerciales con sustancias coadyuvantes que acompañan el ingrediente activo, aumentando su solubilidad y la penetración en la cutícula de artrópodos. En algunos casos, el Clorpirifos formulado resultó ser más tóxico que el ingrediente activo (Demetrio, 2012).

Diversos estudios indican que este compuesto es tóxico para peces, anfibios, ratas y seres humanos, entre otros (Watts, 2012). Resultando muy tóxico, de forma crónica y aguda, para organismos acuáticos, sobre los cuales genera descoordinación motora, retraso en la maduración, daño en el crecimiento y la reproducción y malformaciones. Varios estudios han documentado una aparente conexión entre la presencia de residuos de este compuesto y las reducciones en las poblaciones de anfibios (Lajmanovich et al., 2015).

Bustos López MC (2012) Destino ambiental del Glifosato en una zona arrocería del Tolima, Colombia. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados.

Carrasco AE, Sánchez NE, Tamagno LE (2012) Modelo agrícola e impacto socio-ambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios. Comité de Medio Ambiente de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM). Serie Monográfica Sociedad y Ambiente: Reflexiones para una nueva América Latina. ISSN 2314-1743, Monografía N°1.

- Demetrio M (2012) Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana. Tesis de Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- EPA (US Environmental Protection Agency) <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/chlorpyrifos>. Consultada en 2016.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2015) Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. IARC Monographs, Volume 112
- Lajmanovich RC, Attademo AM, Simoniello MF, Poletta GL, Junges CM, Peltzer PM, Grenón P, Cabagna-Zenklusen MC (2015) Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2,4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water Air Soil Pollut*, 226-427
- Lajmanovich RC, Peltzer PM, Attademo AM, Cabagna Zenklusen M, Junges CM, (2012) Los agroquímicos y sus impactos en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Química Viva*, 3,184–198.
- Relyea R (2005) The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, 15, 618–627.
- Watts M (2012) Chlorpyrifos as a possible global POP. Pesticide Action Network North America. 34pp.

Anexo III - Compuestos sugeridos para su análisis

Herbicidas

- metabolitos de Glifosato
- Atrazina
- derivados fenoxiacéticos (2-4D, MCPA), también llamados hormonales
- Flumetsulam , tomando en cuenta su prolongada persistencia en el suelo y Fluroxipyr por su grupo químico y modo de acción, muy similar a los fenoxiacéticos (2-4D, MCPA)

Insecticidas

- Clorantropilol, es lo que se está prefiriendo usar (como más nuevo), ante la presencia de *Helicoverpa spp.* en soja
- Clorpirifos
- Algún regulador de crecimiento (inhibidores de la síntesis de quitina: Triflururón o Teflubenzurón)

Expertos consultados

Ing. Agr. Msc. Julio Rodríguez Lagreca - asesor en Recursos Naturales, Unidad de Gestión de Proyectos, MGAP

Ing. Agr. Dr. Enrique Castiglioni – docente G4, Centro Universitario Regional Este - UdelAR

Anexo IV – Compuestos incluidos en los análisis de muestras de suelo. Se indican los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) en cada análisis.

Compuesto	Diciembre 2014		Marzo 2015		Unidades
	LD	LC	LD	LC	
Aldrin	0,1	NA	0,5	NA	µg/Kg
alfa HCH	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
AMPA	NA	0,02	NA	0,02	mg/Kg
Atrazina	5,4	NA	2,7	NA	µg/Kg
beta HCH	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
Cipermetrina	4,7	NA	9,37	NA	µg/Kg
Clordano (cis)	0,1	NA	0,05	NA	µg/Kg
Clordano (trans)	0,1	NA	0,08	NA	µg/Kg
Clorpirifos	5,6	NA	0,09	NA	µg/Kg
delta HCH	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
Dieldrin	0,1	NA	0,03	NA	µg/Kg
Endosulfan alfa	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
Endosulfan beta	5,6	NA	0,09	NA	µg/Kg
Endosulfan sulfato	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
Endrin	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
Glifosato	NA	0,02	NA	0,02	mg/Kg
Heptacloro	0,1	NA	0,11	NA	µg/Kg
Heptacloro epoxido	2,6	NA	0,05	NA	µg/Kg
Hexaclorobenceno	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
Lindano	0,9	NA	0,09	NA	µg/Kg
Metoxiclor	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
Mirex	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
Nonaclor (cis)	0,1	NA	0,08	NA	µg/Kg
Nonaclor (trans)	0,1	NA	0,06	NA	µg/Kg
o,p DDD	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
o,p DDE	0,1	NA	0,08	NA	µg/Kg
o,p DDT	0,1	NA	0,05	NA	µg/Kg
Oxiclordano	0,1	NA	0,12	NA	µg/Kg
p,p' DDE	0,1	NA	0,06	NA	µg/Kg
p,p' DDE	0,1	NA	0,09	NA	µg/Kg
p,p' DDT	0,1	NA	0,11	NA	µg/Kg

Anexo V – Imágenes de los puntos de muestreo. Todas las fotografías fueron tomadas por Marcel Achkar, durante el muestreo de diciembre de 2014.



Figura 1. CH1: región inferior de la cuenca, en predio cultivado con soja.



Figura 2. CH2: región inferior-media de la cuenca, inmerso en pradera artificial.



Figura 3. CH3: región media-inferior de la cuenca, inmerso en cultivo de maíz.



Figura 4. CH4: región media de la cuenca, inmerso en pradera artificial.



Figura 5. CH5: región media de la cuenca, inmerso en pradera artificial.



Figura 6. CH6: región media-superior de la cuenca, inmerso en pradera artificial, aprox. 10 cm de agua y 50 cm o más de barro.



Figura 7. CH7: región superior de la cuenca, inmerso en campo natural mejorado, peridomiciliario.



Figura 8. CH8: región superior de la cuenca, inmerso en cultivo de maíz, muy profundo (tuvo que ser muestreado desde afuera).



Figura 9. CH9: región superior de la cuenca, inmerso en campo natural.



Figura 10. CH10: región superior de la cuenca, correspondiente a las nacientes del Arroyo de La Virgen, campo natural. El muestreo de larvas se realizó en pozones entre las rocas.

*No se cuenta con imágenes del CH11

Anexo VI - Análisis de asociación entre sitios, complementarios a los cladogramas de la sección “Validación y análisis de resultados”. Realizados en PAST®.

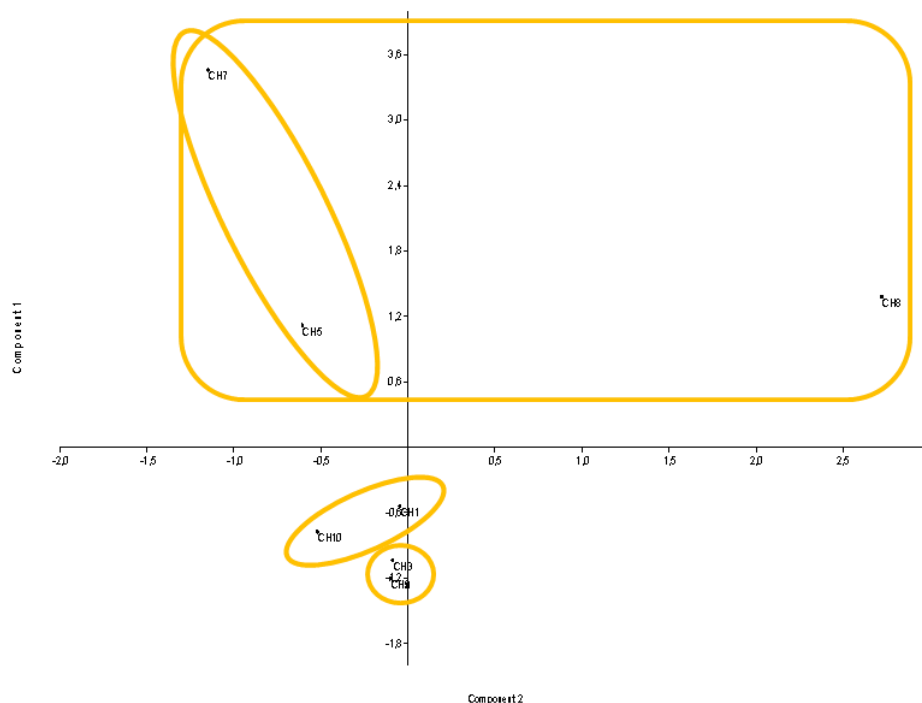


Figura 1. ACP (matriz de correlación) realizado para el conteo de larvas ($\text{LN}(x+1)$) del mes de diciembre de 2014. El Componente 1 explica un 67.127% de la varianza y el Componente 2 un 29.403%.

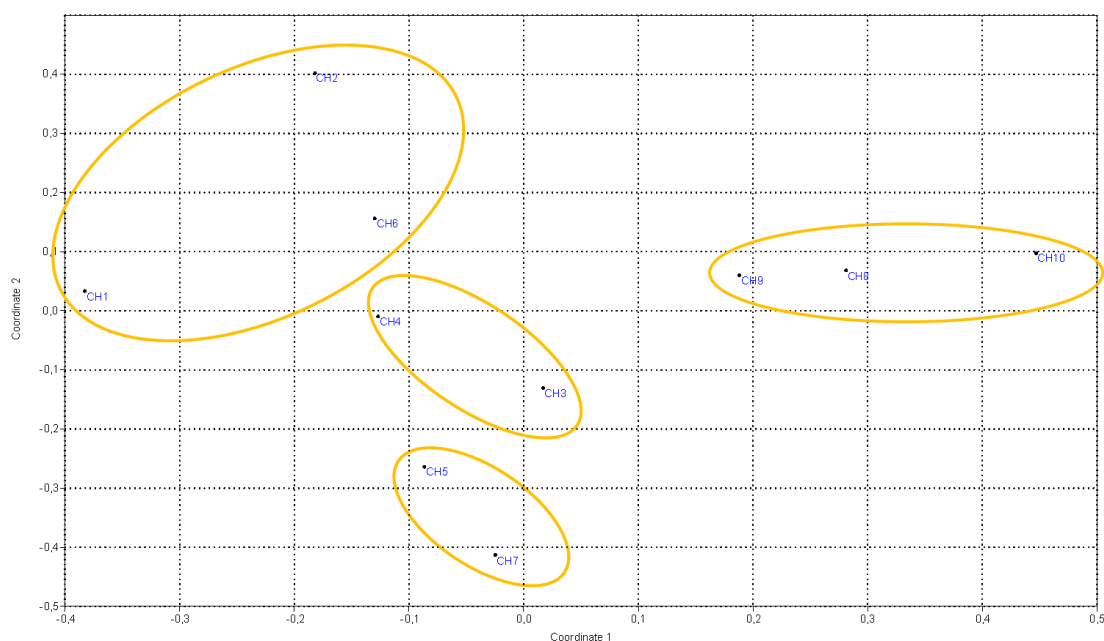


Figura 2. NMDS realizado a partir de la matriz presencia-ausencia total de especies registradas para cada charco (larvas + adultos observados + adultos vocalizando). Índice de similitud empleado: Jaccard, Stress=0.147.

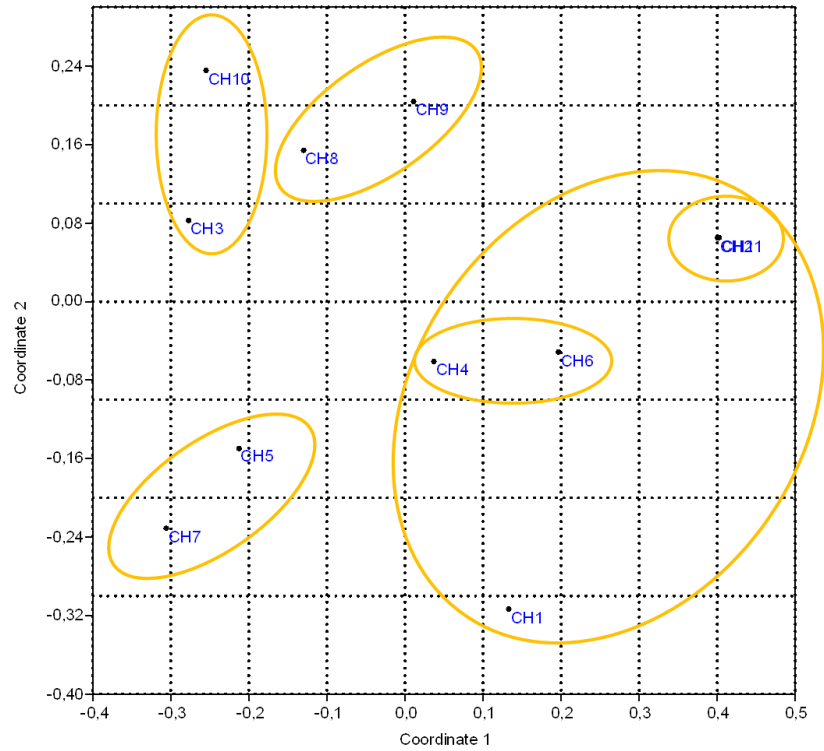


Figura 3. NMDS realizado a partir de la matriz presencia-ausencia de adultos (observados y/o vocalizando). Índice de similitud empleado: Ochiai, Stress=0.1398.

Anexo VII – Modelos generados en R® para cada uno de los fitosanitarios detectados en al menos una muestra, en el muestreo correspondiente a diciembre de 2014, en relación a características morfológicas de larvas de *H. pulchellus*. En todos los casos el modelo que se encuentra resaltado es el que mejor ajusta, de acuerdo al criterio de Akaike (AIC).

a. Modelos para AM (altura del músculo de la cola):

	Intercepto	FS	Cultivo	Pradera	FS*cultivo	FS*pradera	StdDev ~1/estadio	AIC
Ciper- metrina	0,2905 (0,0000)	-0,0059 (0,0018)	0,0828 (0,0001)	0,1865 (0,0000)			0,0777	-148,9016
	0,3427 (0,0000)	-0,0032 (0,1098)					0,0766	-118,3729
	0,3253 (<2E-16)	-0,0129 (1,26E-7)	0,0450 (0,0698)	0,2592 (1,07E-8)				-124,5639
AMPA	0,3640 (0,0000)	-4,2278 (0,1014)	-0,0478 (0,4256)	-0,0618 (0,4469)	4,3074 (0,0948)	4,9094 (0,0598)	0,0897	-145,1028
	0,2825 (0,0000)	0,0919 (0,467)	0,0245 (0,5487)	0,1247 (0,0001)			0,0899	-142,6850
	0,3005 (0,0000)	0,1002 (1E-4)					0,0895	-130,5539
	0,3227 (<2E-16)	0,1349 (0,0437)	-0,0596 (0,3136)	0,1398 (0,0025)				-99,0680
Glifosato	0,2840 (0,0000)	0,0862 (0,0499)	0,0462 (0,1562)	0,1353 (0,0000)			0,0906	-142,5587
	0,3103 (0e+00)	0,1092 (5e-04)					0,0882	-127,8677
	0,3253 (<2e-16)	0,1121 (0,0788)	-0,0203 (0,6674)	0,1542 (0,0007)				-98,0240
Clordano	0,2818 (0,0000)	0,3433 (0,2426)	0,0745 (0,0096)	0,1399 (0,0000)			0,0914	-139,8817
	0,3180 (0,0000)	0,6566 (0,0088)					0,0865	-122,6735
	0,3238 (<2E-16)	0,4568 (0,2993)	0,0149 (0,7200)	0,1616 (0,0005)				-95,8750
Endosulfán alfa	0,3693 (0,0000)	-0,9388 (0,0794)	0,0102 (0,8472)	0,0484 (0,4141)			0,0939	-141,6715
	0,3855 (0)	-1,1231 (0)					0,0963	-143,9223
	0,3500 (8,18e-05)	-0,2633 (0,761)	0,0203 (0,814)	0,1355 (0,146)				-94,8230
Endosulfán sulfato	0,2833 (0,0000)	-0,0359 (0,0405)	0,1166 (0,0000)	0,1428 (0,0000)			0,0922	-142,9101
	0,3403 (0,0000)	-0,0031 (0,8744)					0,0811	-115,7663
	0,3253 (<2E-16)	-0,0311 (0,2264)	0,0613 (0,0654)	0,1602 (0,0005)				-96,2870
Hexacloro- benceno	0,2833 (0,0000)	-0,6832 (0,0405)	0,1166 (0,0000)	0,1428 (0,0000)			0,0922	-142,9101
	0,3403 (0,0000)	-0,0599 (0,8744)					0,0811	-115,7663
	0,3253 (<2E-16)	-0,5916 (0,2264)	0,0613 (0,0654)	0,1602 (0,0005)				-96,2870
Mirex	0,2831 (0,0000)	-0,1670 (0,0405)	0,1327 (0,0000)	0,1436 (0,0000)			0,0926	-142,9006
	0,3331 (0,0000)	0,0559 (0,4679)					0,0828	-116,2773
	0,3253 (<2E-16)	-0,1262 (0,2942)	0,0711 (0,0715)	0,1602 (0,0005)				-95,8990
o.p.	0,2831 (0,0000)	-0,1670 (0,0405)	0,1327 (0,0000)	0,1436 (0,0000)			0,0926	-142,9006
	0,3331 (0,0000)	0,0559 (0,4679)					0,0828	-116,2773
	0,3253 (<2E-16)	-0,5916 (0,2264)	0,0613 (0,0654)	0,1602 (0,0005)				-96,2870
p.p.	0,2831 (0,0000)	-0,1670 (0,0405)	0,1327 (0,0000)	0,1436 (0,0000)			0,0926	-142,9006
	0,3331 (0,0000)	0,0559 (0,4679)					0,0828	-116,2773
	0,3265 (<2e-16)	-0,1301 (0,3775)	0,0797 (0,1104)	0,1590 (0,0006)				-95,5560

b. Modelos para 'forma' (largo del cuerpo / largo total)

	Intercepto	FS	Cultivo	Pradera	FS*cultivo	FS*pradera	StdDev ~1/estadio	AIC
Ciper- metrina	-1,0761 (0,0000)	0,0063 (0,0018)	0,0539 (0,0039)	-0,0567 (0,0262)			0,0294	-292,5351
	-1,0659 (0,0000)	0,0035 (0,0712)					0,0411	-282,1230
	-1,0810 (2e-16)	0,0076 (0,0001)	0,0578 (0,0019)	-0,0741 (0,0034)	NA	NA		-289,7600
AMPA	-0,9309 (0,0000)	-7,2769 (0,0205)	-0,961 (0,1856)	0,0512 (0,6180)	7,2802 (0,0204)	6,0465 (0,0555)	0,0347	-292,5683
	-1,0718 (0,0000)	-0,0096 (0,8430)	0,0528 (0,1974)	-0,0269 (0,3002)			0,0389	-283,1854
	-1,0730 (0,0000)	0,0452 (0,0463)					0,0424	-282,9464
Glifosato	-0,9296 (2e-16)	-7,7207 (0,0185)	-0,0952 (0,2120)	0,0715 (0,5089)	7,7228 (0,0185)	6,2609 (0,0579)		-286,2400
	-1,0719 (0,0000)	0,0154 (0,7424)	0,0371 (0,2493)	-0,0294 (0,2357)			0,0390	-283,2564
	-1,0719 (0,0000)	0,0613 (0,0274)					0,0421	-283,8546
Clordano	-1,0810 (2e-16)	-5,8795 (0,0002)	0,0490 (0,1274)	0,2887 (0,0019)	5,8951 (0,0002)	NA		-286,8300
	-1,0722 (0,0000)	0,2936 (0,3550)	0,0269 (0,3284)	-0,0286 (0,2455)			0,0390	-284,0274
	-1,0723 (0,0000)	0,5495 (0,0115)					0,0417	-285,3895
Endosulfán alta	-1,08299 (2e-16)	2,0060 (0,0350)	0,0573 (0,0561)	-0,0412 (0,0958)	-1,9694 (0,0520)	NA		-277,3600
	-0,9304 (0,0000)	-1,4446 (0,0236)	-0,0958 (0,1396)	-0,1715 (0,0115)			0,0383	-288,4441
	-1,0453 (0,0000)	-0,2740 (0,0899)					0,0440	-281,8790
Endosulfán sulfato	-0,9296 (2e-16)	-1,5441 (0,0217)	-0,0935 (0,1707)	-0,1946 (0,0059)	NA	NA		-280,1600
	-1,0720 (0,0000)	-0,0250 (0,1822)	0,0597 (0,0062)	-0,0278 (0,2561)			0,0390	-284,9810
	-1,0634 (0,0000)	0,0015 (0,9254)					0,0457	-278,9740
Hexacloro- benceno	-1,0810 (2e-16)	-0,0235 (0,2296)	0,0704 (0,0015)	-0,0432 (0,0828)	NA	NA		-276,2200
	-1,0720 (0,0000)	-0,4766 (0,1822)	0,0597 (0,0062)	-0,0278 (0,2561)			0,0390	-284,9810
	-1,0634 (0,0000)	0,0295 (0,9254)					0,0457	-278,9740
Mirex	-1,08101 (2e-16)	-0,4480 (0,2296)	0,0704 (0,0015)	-0,0432 (0,0828)	NA	NA		-276,2200
	-1,0720 (0,0000)	-0,1352 (0,1173)	0,0743 (0,0051)	-0,0275 (0,2616)			0,0390	-285,6765
	-1,0654 (0,0000)	0,0420 (0,5008)					0,0448	-279,4188
o.p.	-1,0810 (2-e16)	-0,1294 (0,1520)	0,0845 (0,0018)	-0,0432 (0,0822)	NA	NA		-276,8500
	-1,0720 (0,0000)	-0,4766 (0,1822)	0,0597 (0,0062)	-0,0278 (0,2561)			0,0390	-284,9810
	-1,0634 (0,0000)	0,0295 (0,9254)					0,0457	-278,9740
p.p.	-1,0810 (2e-16)	-0,4480 (0,2296)	0,0704 (0,0015)	-0,0432 (0,0828)	NA	NA		-276,2200
	-1,0716 (0,0000)	-0,1238 (0,2297)	0,0795 (0,0202)	-0,0277 (0,2596)			0,0390	-284,6331
	-1,0692 (0,0000)	0,0850 (0,1392)					0,0430	-281,1480
	-1,0840 (2e-16)	1,0208 (0,0155)	0,1132 (0,0015)	-0,0402 (0,0994)	-1,2135 (0,0055)	NA		-281,9100