

Efectos de la agricultura sobre la bioacumulación de plaguicidas y el estado de salud en peces de arroyos vadeables de Río Negro.

Trabajo final de grado para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.



Victoria Acuña.
Diciembre 2021.
Montevideo, Uruguay
Orientador: Dr. Guillermo Chalar
Co-orientador: Dr. Iván González-Bergonzoni

Índice

Agradecimientos	2
Resumen	3
Introducción	4
Uso de pesticidas	
Biomonitoreo de calidad de agua	5
Vías de exposición y métodos de cuantificación de fitosanitarios en peces	6
Efectos fisiológicos de los plaguicidas en peces	7
Elección de especies bioindicadoras	9
Propuesta de trabajo	11
Hipótesis general	
Predicciones	
Objetivos	12
Objetivo general	
Objetivos específicos	
Materiales y métodos	12
Área de estudio	
Obtención y procesamiento primario de las muestras	15
Análisis de estado de salud de <i>B. iheringii</i> y <i>C. interruptus</i>	16
Cuantificación de residuos de pesticidas	17
Extracción y purificación	18
Análisis por LC-MS/MS y GC-MS	
Resultados	20
Detección de pesticidas	
Malformaciones	
Infección parasitaria	
Análisis de <i>B. iheringii</i>	21
Colecta	
Talla y condición corporal	
Contenido de grasa visceral	22
Índices gonadosomático y hepatoesomático	
Análisis de <i>C. interruptus</i>	24
Colecta	
Talla y condición corporal	
Contenido de grasa visceral	25
Índices gonadosomático y hepatoesomático	
Discusión	27
Predicción 1	
Predicción 2	30
Predicción 3	
Predicción 4	31
Predicción 5	
Conclusiones	33
Perspectivas	34
Bibliografía	35
Anexos	44

Agradecimientos

A mis tutores, Guille e Iván, por todo el apoyo, sugerencias y buena onda durante todo este tiempo. A Guille, por confiar y creer en mí desde el primer día. A Iván, por integrarme en un grupo de trabajo hermoso y muy humano como es el Polo de Ecología Fluvial.

Al Dr. Andrés Pérez del CURE, por sumarse a colaborar en la tesina, por explicarme con paciencia el protocolo del análisis de pesticidas y por aguantar mi ansiedad por los resultados. A la Lic. Ana Lucía Mary del CENUR Norte por darme una mano enorme solucionando dudas del QGIS, y a la Dra. Christine Lucas por ponernos en contacto.

A mis amigas, Belén y Pía, que me las dió la facultad y yo me las quedo para la vida. A Diego, por ser mi cable a tierra.

Y finalmente a mi familia, especialmente a mis padres, porque todo lo que soy y aprendo a ser es gracias a ellos.

Resumen

Durante las últimas décadas, la producción agrícola se ha intensificado y expandido hacia áreas menos aptas para el cultivo gracias al desarrollo de prácticas agrícolas modernas, entre las cuales se encuentra un aumento en el uso de insumos fitosanitarios de producción industrial. Los métodos de aplicación de los mismos permiten la movilización de una alta diversidad de principios activos en el ambiente y en consecuencia, su ingreso a los ecosistemas acuáticos. Por ello se estima que gran parte de los insecticidas y herbicidas utilizados (entre el 95 y 98%) alcanzan a los organismos no blanco (USEPA, 2002). Una de las estrategias más directas a la hora de analizar la contaminación por plaguicidas en la biota es a través del análisis de bioacumulación de dichas sustancias en los tejidos de los organismos expuestos. Sin embargo, la mayor parte de los escenarios de exposición suceden en bajas concentraciones de fitosanitarios lo que conlleva que los compuestos podrían no bioacumularse en niveles detectables y aún así producir efectos subletales y crónicos complejos de evaluar. Debido a esto es necesario hallar indicadores que revelen estados de estrés fisiológico y vulnerabilidad general en peces.

Este trabajo se enmarca bajo la hipótesis de que dos especies bioindicadoras de peces, *Bryconamericus iheringii* y *Cheirodon interruptus*, bioacumulan plaguicidas diferencialmente entre microcuencas con distinta intensidad de actividades agrícolas. Dicha exposición crónica contribuye a un estado general de vulnerabilidad de los organismos, reflejado en la presencia de malformaciones y en altas tasas de parasitismo. Además, el estrés fisiológico que conlleva la eliminación de tóxicos resulta en menores tamaños y condiciones corporales, mayor desarrollo hepático y menor desarrollo de las gónadas. Para evaluar las predicciones que se generan en base a la hipótesis se llevan a cabo distintas aproximaciones: i) análisis de bioacumulación en músculo de los organismos, ii) búsqueda de malformaciones y parasitismo, iii) determinación de tallas y condición corporal y iv) obtención de índices gonadosomáticos y hepatosomáticos. Las especies de interés fueron recolectadas en arroyos vadeables de la cuenca alta y media del Río Negro, en sitios con actividad agrícola (3) y con cobertura natural (3) previamente caracterizados y con antecedentes conocidos de bioacumulación de residuos de fitosanitarios en distintas especies de peces no migradoras. El análisis de presencia de pesticidas reveló una concentración de 10.3 ug/kg del fungicida azoxistrobin y detectó el insecticida cipermetrina por debajo de los niveles de cuantificación, ambos en *B. iheringii* y en un sitio con cobertura natural con acceso de ganado al cuerpo de agua. En general, no se hallaron diferencias significativas de las variables de talla, condición corporal e índices hepatosomáticos y gonadosomáticos con respecto a la intensidad de la actividad agrícola. La vulneración del estado de salud se reflejó estrictamente en altas prevalencias de parasitismo para ambas especies, con mayor sensibilidad de *B. iheringii*, en sitios tanto agrícolas como naturales. En conjunto, la capacidad de bioacumular plaguicidas y la mayor sensibilidad con respecto a las infecciones parasitarias posiblemente hacen de *B. iheringii* un mejor bioindicador de contaminantes que *C. interruptus* en cursos de agua vadeables.

Introducción

Uso de pesticidas

Durante las últimas décadas, la producción agrícola se ha intensificado y expandido hacia áreas menos aptas para el cultivo. La base de los incrementos radica en un cambio desde las técnicas tradicionales de cultivo hacia las llamadas prácticas agrícolas modernas, que implican un aumento en el uso de insumos de fertilizantes y fitosanitarios de producción industrial (Köhler & Triebkorn, 2013). Particularmente, los plaguicidas se aplican ampliamente tanto en áreas agrícolas como urbanas, y la mezcla de distintos compuestos tienen la función de mejorar la eficacia y reducir el costo del tratamiento de plagas en los cultivos. Los métodos de aplicación, rociado y espolvoreado, generan la movilización de una alta diversidad de principios activos en el ambiente y en consecuencia, el ingreso de los mismos a los ecosistemas acuáticos (Pérez-Parada et al., 2018).

Una vez que alcanzan el ambiente acuático, los fitosanitarios se diseminan en forma de mezclas complejas de compuestos con distintas propiedades químicas y de toxicidad variable (Köhler & Triebkorn, 2013). El destino y comportamiento de los distintos pesticidas de uso actual (currently used pesticides, CUPs) en el medio acuático suele determinarse a grandes rasgos por propiedades fisicoquímicas como el coeficiente de partición carbón orgánico-agua (K_{oc}), el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) y la constante de disociación (K_a) (Pérez-Parada et al., 2018). Estas características se utilizan para predecir la partición diferencial de los compuestos entre los distintos compartimentos ambientales (Ernst et al., 2018; Zhang & Kelly (2018). Es así que, por ejemplo, aquellos con mayor solubilidad en agua serán detectados con mayor frecuencia en la fase acuosa, mientras que los de solubilidad media y menor son capaces de interactuar con partículas orgánicas en suspensión y con los tejidos biológicos (Pérez-Parada et al., 2018). La cuantificación de los residuos dependerá en gran parte de sus propiedades de afinidad y degradación, pudiendo ser detectados en una única matriz o en más de una, de forma puntual o reiterada en el tiempo (Pérez-Parada et al., 2018).

La presencia de pesticidas y sus metabolitos en todas las matrices comúnmente analizadas (agua superficial y subterránea, sedimento y biota) ha sido vinculada fuertemente con escenarios de prácticas agrícolas dominantes (Pascual et al., 2017; Schreinemachers & Tipraqsa, 2012). En general, los trabajos vinculados a la temática exhiben un gran rango de concentración de los residuos de plaguicidas determinados tanto para agua como para biota que oscilan desde pocos ng/L hasta varios $\mu\text{g/L}$ (Akoto et al., 2016; Belenguer et al., 2014; Ccancapa et al., 2016; De Gerónimo et al., 2014; Ernst et al., 2018; Masiá et al., 2015; Page et al., 2014; Rocha et al., 2015). Es importante destacar que si bien muchos fitosanitarios son cuantificables en agua y sedimentos, también son detectados frecuentemente en los tejidos de organismos expuestos. De esta forma, es posible cuantificar principios activos bioacumulados en la biota aún cuando teóricamente no se están realizando aplicaciones sobre los cultivos contiguos al cuerpo de agua (Ccancapa et al., 2016), por lo que establece una clara evidencia de que el monitoreo en matrices abióticas por sí solo no es suficiente para conocer la persistencia de los contaminantes en el ambiente (Akoto et al., 2016; Belenguer et al., 2014; Pascual et al., 2017; Pérez-Parada et al., 2018).

Biomonitoreo de calidad de agua

Una estrategia de estudio que aporta una visión integral del estado de un ambiente y sus componentes es el biomonitoreo, el cual siempre resulta útil para identificar riesgos y generar líneas de priorización para el manejo ambiental (Chalar et al., 2013). La base de esta metodología es la identificación de organismos cuya presencia, ausencia o cambios de abundancia, morfología o comportamiento generan indicios sobre el estado de conservación de un ambiente determinado (van der Oost et al., 2003). Una aproximación adicional es el uso de biomarcadores, que reflejan las respuestas fisiológicas producidas por los individuos debido al estrés generado por la exposición a contaminantes (van der Oost et al., 2003).

En el caso de los ambientes acuáticos se suele utilizar como organismos indicadores a los macroinvertebrados y peces. En el análisis de persistencia de fitosanitarios en la biota, los peces se han propuesto como los bioindicadores ideales o de mayor preferencia a nivel mundial puesto que son sensibles a la salud de los ecosistemas acuáticos y a los cambios en los usos del suelo (Karr 1981; Zhou et al., 2008). Una de las principales razones por las cuales se avala el uso de dichos organismos es que en sus tejidos pueden acumular en cantidades detectables y cuantificables las sustancias químicas que ingresan gracias al contacto directo con agua, sedimentos y alimentos contaminados (van der Oost et al., 2003; Zhou et al., 2008). Otra ventaja es la posibilidad de dirigir estudios a distintas escalas, por lo que el uso de especies no migratorias representa una fuente confiable de las dinámicas espacio-temporales de la exposición a contaminantes y de los efectos de su presencia en el ambiente (Ernst et al., 2018).

En Uruguay, la biocumulación de fitosanitarios en músculo de peces ha generado evidencia que confirma una contaminación generalizada de los sistemas acuáticos con los residuos de dichos productos. El uso de especies bioindicadores locales ha permitido asociar los niveles de contaminación con el uso del suelo, con la intensidad de las actividades productivas y con la naturaleza de los principios activos de los compuestos usados (Arocena et al., 2018; Ernst et al., 2018). González-Bergonzoni et al. (2019) han hallado que cuanto mayor sea la intensidad de las prácticas agrícolas, mayor será la cantidad y concentración de sustancias activas detectables y/o cuantificables. Frecuentemente, se han reportado mortandades masivas de dichos organismos en sitios próximos a donde la cuantificación de pesticidas en agua supera las permitidas para la protección de la biota acuática (CARU, 2019). Este patrón atraviesa escalas espaciales, puesto que se ha evidenciado tanto en el Río Uruguay (CARU, 2016, 2019) como en arroyos de bajo orden en el Río Negro (González-Bergonzoni et al., 2019), así como en el sistema léntico de la Laguna del Cisne (Teixeira de Mello et al., 2020). Además, Zaldúa et al., (2010) halló concentraciones de endosulfán entre 0,009 y 0,052 mg/kg y DDT relictual (< 0,0001 mg/kg) en el sitio RAMSAR Parque Nacional de Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. CARU (2016) informó sobre la presencia de quince insecticidas, tres herbicidas y dos fungicidas detectables en el Río Uruguay en al menos una campaña de muestreo. Stábile (2018) detectó cuatro plaguicidas en músculo de diferentes especies en la Laguna del Sauce con concentraciones menores al límite de cuantificación. Ernst et al., (2018), en la cauce principal del Río Negro detectó en promedio cuatro pesticidas por pez, con un máximo de hasta veintidós compuestos en el músculo de una especie migratoria capturada en Nuevo Berlín. González-Bergonzoni et al., (2019) informó de un total de doce residuos de pesticidas bioacumulados en peces de arroyos vadeables de la cuenca de Río Negro.

Vías de exposición, bioacumulación y cuantificación de fitosanitarios en peces

Los plaguicidas de uso actual están diseñados de forma que su modo de acción muestre eficiencias óptimas para los organismos objetivo y efectos colaterales mínimos para aquellos que no lo sean (Köhler & Triebkorn, 2013). A pesar de ello, se estima que gran parte de los insecticidas y herbicidas utilizados (entre el 95 y 98%) alcanzan a los organismos no blanco (USEPA, 2002). La exposición de los peces a los pesticidas se relaciona con la distribución de los mismos entre los distintos compartimentos del ambiente (atmósfera, suelo, agua superficial, subsuperficial y subterránea), su transporte entre matrices y a su destino en cada una (Pérez-Parada et al., 2018). Además, dicha exposición puede ocurrir durante períodos prolongados o en instancias puntuales y a través de una o más vías, siendo las principales por contacto directo con agua contaminada y por ingesta (Pérez-Parada et al., 2018). En la última, las interacciones tróficas y los hábitos alimenticios cumplen un importante rol dado los procesos de bioacumulación y biomagnificación ampliamente descritos (Arnot & Gobas, 2004; Clasen et al., 2018; Hoekstra et al., 2003; Pérez-Parada et al., 2018; Rocha et al., 2015).

Una forma de estimar el nivel de exposición es a través de la cuantificación directa de residuos de pesticidas en los tejidos biológicos tales como el músculo o el hígado (Sapozhnikova et al., 2004). La bioacumulación en sí misma se ha propuesto como un biomarcador de exposición debido a que permite la medición de una sustancia exógena (tanto de la sustancia activa y metabolitos como de un producto generado entre el agente xenobiótico y una molécula o célula diana) (van der Oost et al., 2003). Las eventuales variaciones en la concentración de los pesticidas bioacumulados suelen ser mayor a las esperadas para una misma especie y en una misma instancia de muestreo (Daverat et al., 2011; Scholes et al., 2016); y podrían estar explicadas por diversos factores en la historia de vida de los peces. A modo de ejemplo, aquellos individuos de mayor tamaño tienen menores tasas de crecimiento y de depuración, lo que podría conducir a mayores concentraciones de contaminantes) (Gewurtz et al., 2011; Bureau et al., 2006). De la misma forma, los peces adultos suelen tener mayor concentración de residuos debido a un mayor tiempo de exposición (Miranda et al., 2008).

La metodología QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) para la detección de una batería multiclase de pesticidas en concentraciones traza ha sido ampliamente utilizada en los últimos años en distintas matrices bióticas en el país (Ernst et al., 2018, González-Bergonzoni et al., 2019, Machado et al., 2017, Pareja et al., 2011). El método fue recientemente refinado en (Colazzo et al., 2019), con resultados preliminares satisfactorios para sesenta y siete (67) compuestos asociados al paquete tecnológico agrícola sudamericano. El nivel de detección se encuentra por debajo de las partes por billón (ppb), en rangos de entre 1-15 ug/kg. El desempeño de QuEChERS fue evaluado positivamente en (Colazzo et al., 2019) según los criterios de recuperación de los residuos de pesticidas, los límites de cuantificación de los mismos y la precisión en la identificación de los compuestos. Otros parámetros relevantes a la hora de evaluar la solidez del método son A) el cumplimiento de la linealidad ($R^2 > 0,99$) entre concentraciones de pesticidas conocidos probadas y las concentraciones recuperadas con las cromatografías y B) la no significancia de los efectos de supresión o mejora de la señal de pesticidas que ocasiona la interacción de los mismos con la matriz cromatográfica.

Efectos fisiológicos de los plaguicidas en peces

Las consecuencias de la contaminación por fitosanitarios a largo plazo no son cuestiones totalmente comprendidas (Pérez-Parada et al., 2018). En los cuerpos de agua co-ocurren, como regla general, más de un plaguicida (Bacchetta et al., 2014). Las mezclas pueden generar efectos aditivos, antagónicos o sinérgicos sobre los organismos expuestos (Chapman 1996; Fernández-alba et al., 2001, 2002). Los eventos puntuales de altas concentraciones de plaguicidas en el ambiente pueden generar efectos agudos letales que potencialmente se traduzcan en mortandades de peces (CARU 2019). No obstante, la mayor parte de los escenarios de exposición suceden en bajas concentraciones de contaminantes, las cuales podrían producir efectos subletales y crónicos más complejos de evaluar (Halmelink & Spacie, 1977). A modo de ejemplo, se han generado evidencias de que algunas especies de peces son capaces de detectar y alejarse activamente de sitios aún con bajas concentraciones de fitosanitarios, conduciendo a una posible fragmentación del hábitat a través de cambios en el comportamiento (Araújo et al., 2018). Sin embargo, los esfuerzos de investigación relativa de las secuelas de la exposición se han centrado mayormente en los efectos fisiológicos, a nivel individual y bajo supuestos de contaminación por uno o dos compuestos (Bacchetta et al., 2014).

Al momento de evaluar el efecto de la exposición a contaminantes y hábitats degradados, suelen realizarse aproximaciones que permiten evaluar rápida y de forma general el estado de salud de las poblaciones locales. Algunos indicadores de estrés fisiológico suelen ser la presencia y prevalencia de tumores, parasitismos y anomalías o malformaciones esqueléticas o en aletas (Steedman, 1991). La literatura acerca del vínculo entre estados de salud vulnerables provocados por la exposición a contaminantes, particularmente en fitosanitarios, y la infección por parásitos no ha sido ampliamente estudiada (Poulin, 1992). Generalmente, se utilizan ensayos inmunológicos como indicadores de estrés y facilitadores de infecciones, tales como la supresión de respuesta inmunológica dada por reducción del número de leucocitos y fagocitos, así como en daño a los órganos linfoides y mucosas protectoras (Poulin, 1992). En adición al decremento del sistema inmunológico se han establecido efectos sinérgicos entre la exposición a determinados plaguicidas y el parasitismo que conducen a alteraciones a nivel neurológico, endocrino y comportamental (Renick et al., 2016), así como se han vinculado a mayor tasas de malformaciones (Kelly et al., 2010a; Kelly et al., 2010b).

A nivel poblacional, el cálculo del factor de condición corporal (K), obtenido para cada organismo, generalmente se utiliza como un índice indicativo del grado de bienestar de un pez, reflejando la condición nutricional reciente y evidenciando las interacciones entre factores bióticos y abióticos sobre las condiciones fisiológicas de los organismos (Anderson & Neumann, 1996; Vazzoler, 1996). Dicho factor es, concretamente, el cociente del peso y del producto entre el largo corporal de cada organismo con el factor de crecimiento alométrico (b) de la especie. Existe evidencia de la reducción de la condición corporal para distintas especies de peces ante la exposición a plaguicidas. A modo de ejemplo, Brodeur et al., (2017) halló una correlación entre altos niveles de insecticidas y la inhibición de la actividad de las colinesterasas (ChE, enzimas cruciales para la transmisión del impulso nervioso a las placas motoras), asociados a la reducción del K en *Jenynsia multidentata*. El mismo resultado se ha observado en peces de la especie *Channa striata* expuesto a diazinon (Brodeur et al., 2016). Rossi et al., (2020) detectó en *Astyanax lacustris* y *Markiana nigripinnis* nuevamente una

disminución de la condición corporal acompañada de mayor desarrollo del índice hepatosomático.

Se ha recopilado evidencia mediante bioensayos sobre efectos neurotóxicos, estrés oxidativo, alteraciones en vías metabólicas y disrupción endocrina en individuos expuestos a mezclas de plaguicidas (Cleary et al., 2019; Dietz et al., 2019; Rossi et al., 2020). Algunas hipótesis asociadas son la existencia de un incremento de estrés sobre órganos específicos, tales como el hígado y los riñones, a través de vías de disrupción endocrina no sexuales que involucran la regulación y metabolismo de lípidos (Pérez-Parada et al., 2018; Scott et al., 2018). Estudios a nivel proteómico, han demostrado cambios metabólicos en el hígado que inhiben los mecanismos de apoptosis cuando existe una exposición a mezclas de herbicidas y fungicidas (Gandar et al., 2017). Clasen et al., (2018) han demostrado que la exposición a combinaciones de fungicidas e insecticidas comúnmente usados en cultivos de arroz inducen estrés oxidativo evidenciado por cambios en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en carpas (*Cyprinus carpio*). Los insecticidas aldrin y metolaclor en concentraciones menores a 1 mg/L a su vez han demostrado propiedades de disrupción endocrina sexual, con efectos adversos en etapas tempranas de la espermatogénesis (Das Neves et al., 2018).

En este trabajo se realiza una búsqueda de posibles indicadores de estrés fisiológico asociados a la exposición de plaguicidas dada por la agricultura de secano, particularmente de soja. El paquete tecnológico de fitosanitarios se utiliza principalmente en dos momentos del proceso productivo: durante la emergencia de las plántulas y en la prevención y tratamiento de las enfermedades de fin de ciclo (Ivancovich, 2018). En primer instancia se utilizan herbicidas de amplio espectro para la erradicación de las malezas presentes en el suelo, y su aplicación puede ser pre o post emergencia. En la segunda instancia de aplicación masiva de plaguicidas se utilizan dos grandes grupos de antifúngicos: las estrobilurinas de acción preventiva y triazoles de acción curativa (Ivancovich, 2018). La mayor parte de los sitios, tanto controles como con actividad agrícola, cuentan con especies de peces propuestas como buenas bioindicadores de calidad de agua y con antecedentes de detección de plaguicidas (González-Bergonzoni et al., 2019). Los compuestos detectados hasta el momento representan amenazas sólidas para la salud de los organismos acuáticos (González-Bergonzoni et al., 2019); como son los fungicidas del grupo químico de las estrobilurinas azoxistrobina, piraclostrobin y trifloxistrobin, que actúan inhibiendo la respiración mitocondrial (Elskus, 2012), desencadenando estrés oxidativo celular y la interrupción del metabolismo (Olsvik et al., 2010). El acetoclor y epoxiconazole también han sido ampliamente revisados debido a su toxicidad en peces. El fungicida epoxiconazole, del grupo de los triazoles, ha demostrado alteraciones en las vías de obtención de energía así como en las rutas metabólicas de lípidos y aminoácidos (Jia et al., 2019). Por su parte, el herbicida acetoclor es un importante teratógeno que produce anomalías durante el desarrollo embrionario y larval, tales como malformaciones en la curvatura espinal, reducción de la formación de neuronas e inducción de apoptosis en dichas regiones (Wang et al., 2019a). Finalmente, la persistencia del herbicida atrazina, prohibido en 2016 y aún detectable (Resolución N° 104/016 de la Dirección General de Servicios Agrícolas), puede ocasionar disrupción endocrina alterando los tejidos reproductivos masculinos y la proporción de sexos en poblaciones de peces (Wang et al., 2019b).

Elección de especies bioindicadoras

Las principales características que hacen de *Bryconamericus iheringii* (*B. iheringii*) y *Cheirodon interruptus* (*C. interruptus*) posibles buenas bioindicadoras de contaminación de los ambientes acuáticos es que ambas son sensibles a cambios en la calidad del agua, con ejemplos aplicados para Uruguay y la región (Arocena et al., 2018; Bistoni et al., 1999, Caetano & Jané, 2018, Teixeira de Mello 2007a, Teixeira de Mello et al., 2011). Si bien ambas especies no han sido probadas específicamente como buenas bioindicadoras de la persistencia de fitosanitarios, existen grandes posibilidades de que sean eficaces dada su sensibilidad a otra clase de condiciones ambientales alteradas, tales como contaminación por materia orgánica y estados de eutrofización (Chalar et al., 2013; Delbene 2010; Teixeira de Mello 2007a). La elección de especies similares se fundamenta en que ambas tienen vías de exposición simples (mayormente por contacto con el agua) y pertenecen a un mismo grupo trófico de bajo nivel (Barbosa et al., 2003; Beltran et al., 2011). Además, están presentes en grandes abundancias y son conspicuas en todo el país, particularmente en los arroyos de interés del trabajo. Finalmente, son organismos de fácil muestreo y suelen estar restringidos a sus hábitats (especies no migratorias) (Teixeira de Mello 2007a; Delbene 2010).

Bryconamericus iheringii (*B. iheringii*) fue descrita por primera vez por Boulenger en 1887. Es un pequeño pez carácido que habita en ríos, arroyos y lagunas y es cosmopolita en la cuenca del Río de la Plata. Suele ser más abundante en ambientes con escasa vegetación riparia y con sustrato inestable (Caetano & Jané, 2018). Es una especie omnívora generalista y oportunista, con alto grado de plasticidad trófica dependiendo los recursos disponibles (Kokubun et al., 2018). En Uruguay, se ha evidenciado la ingesta principalmente de algas y detritos durante el verano y de invertebrados acuáticos y terrestres durante el invierno (González-Bergonzoni et al., 2015). En lo relativo a aspectos reproductivos se ha visto reiteradamente que la razón entre los sexos difiere de 1:1 (Ferriz et al., 2010) y que cuentan con un sólo período reproductivo a finales del invierno y principios de la primavera, entre los meses de Agosto y Noviembre tanto para Argentina como para Uruguay en arroyos con diversos usos del suelo (Ferriz et al., 2010, González-Bergonzoni et al., 2015). Los estudios más exhaustivos que proveen la evidencia de dicho período reproductivo han encontrado que la distribución de tallas varía a lo largo del año de forma tal que los ejemplares de menor tamaño (<2.5 cm, juveniles) dominan en Noviembre, los de largo intermedio (2.6 cm-4.0 cm) se encuentran mayormente entre Diciembre y Abril y finalmente las tallas mayores (>4.1 cm) desde finales del verano hasta el invierno (Abril- Agosto) (Ferriz et al., 2010). En organismos extraídos del cauce principal del Río Negro (cuenca media, Uruguay) el coeficiente de crecimiento alométrico (b) ha sido determinado de 2.97 para individuos con tallas de entre 1.2 cm y 9.0 cm (Teixeira de Mello et al., 2011). Los factores de condición han demostrado variabilidad según la disponibilidad de alimento y la exposición a presiones antrópicas (Caetano & Jané, 2018, Ferriz et al., 2010).

Cheirodon interruptus (*C. interruptus*) fue descrita por Jenyns en 1842. Es una especie de pez carácido y de pequeño porte. Es cosmopolita dentro de la cuenca del Río de la Plata, siendo su hábitat típico ríos, arroyos, lagunas y humedales. Su alimentación en arroyos de cabecera de cuenca está dada principalmente por materia vegetal durante todo el año (González-Bergonzoni et al., 2015). Nuevamente, la proporción de sexos difiere de la razón 1:1 a favor de las hembras en la mayor parte del año (Ferriz et al., 2011). La reproducción de *C. interruptus* se encuentra bien documentada. Si bien Menni & Almirón (1994) la consideran

una especie oportunista capaz de reproducirse gran parte del año en ambientes favorables; existen trabajos recientes que acotan el período temporal. En arroyos de cuenca alta en Argentina, López & Sidorkewicz (2005) demuestran que la especie genera dos cohortes por año, una en primavera (Septiembre-Noviembre) y otra en otoño, siendo el primero el de mayor desove. De esta forma, las tallas mínimas (<1.9 cm, juveniles) suelen predominar en los meses de Noviembre y Diciembre (finales de primavera y verano) (Ferriz et al., 2011). A su vez, López & Sidorkewicz (2005) ha colectado en invierno individuos de pequeño tamaño, con escamas pequeñas y sin marcación (indicios de nacimiento reciente). Los organismos de tamaños intermedios (2.0 cm - 2.9 cm) han sido hallados durante todo el año y aquellos de mayor talla (> 3.0 cm) fueron dominantes en los meses de otoño (Marzo-Abril) e invierno (especialmente en Julio) (Ferriz et al., 2011). Los mismos autores, han determinado un factor de crecimiento alométrico de 3.27 en arroyos expuesto a explotación ganadera y con longitudes corporales entre 1.5 cm y 4.9 cm (Ferriz et al., 2011).

Propuesta de trabajo

La hipótesis general de trabajo fue que las especies bioindicadoras *B. iheringii* y *C. interruptus* bioacumulan plaguicidas diferencialmente entre microcuencas con distinta intensidad de actividades agrícolas. De esta forma, se realiza la comparación entre microcuencas con distinta superficie cultivada con soja vinculadas previamente al uso de fitosanitarios y microcuencas control, con cobertura de pradera y posible uso ganadero extensivo. La acumulación de contaminantes contribuiría a un estado general de estrés fisiológico y vulnerabilidad de los organismos que podría evaluarse utilizando potenciales indicadores de efecto tales como: presencia de malformaciones, altas tasas de parasitismo interno, reducciones en la talla y condición corporal y cambios en los índices hepatosomático y gonadosomático.

Las predicciones asociadas a la hipótesis fueron:

A) Será posible detectar residuos de pesticidas en el músculo de los organismos que habitan en arroyos contiguos a áreas cultivadas con soja y no así en las subcuencas control.

B) Será posible detectar estados generales de vulnerabilidad en individuos de sitios impactados, tales como malformaciones corporales o alta prevalencia de infección con parásitos.

C) Los organismos provenientes de sitios agrícolas presentarán una tendencia a la reducción de sus tamaños corporales, reflejada en cambios en la estructura de tallas de la población, y a su vez tendrán menores factores de condición (K) debido a un mayor gasto energético dirigido hacia la desintoxicación de fitosanitarios en lugar de destinarse al crecimiento.

D) El hígado tendrá un mayor tamaño en individuos provenientes de sitios agrícolas que en aquellos control, debido a la necesidad de estar más desarrollado para procesar mayor cantidad de contaminantes.

E) Los organismos provenientes de sitios agrícolas tendrán un menor desarrollo gonadal que los extraídos de sitios naturales, vinculado a un menor gasto energético dirigido hacia la reproducción y por posibles efectos de disrupción endocrina, generados por la exposición crónica a plaguicidas.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar los efectos de la agricultura sobre la bioacumulación de pesticidas en *Bryconamericus iheringii* y *Cheirodon interruptus* y su potencial efecto sobre indicadores del estado de salud de los organismos

Objetivos específicos

- 1) Detectar y cuantificar la bioacumulación de pesticidas en músculo de peces provenientes de microcuencas con distinto uso del suelo.
- 2) Evaluar la presencia de malformaciones e infección por parásitos en los individuos provenientes de microcuencas con distinto uso del suelo.
- 3) Determinar si existe una reducción en las tallas de organismos provenientes de sitios con actividad agrícola y antecedentes de bioacumulación de fitosanitarios.
- 4) Determinar si existe una reducción en la condición corporal de organismos provenientes de sitios con actividad agrícola y antecedentes de bioacumulación de fitosanitarios.
- 5) Obtener índices gonadosomáticos y hepatosomáticos en las especies de interés para microcuencas con distinto uso del suelo.

Materiales y métodos

Área de estudio y antecedentes

Los sitios de estudio (Figura 1, Anexo 1) se encuentran en la cuenca alta y media del Río Negro, particularmente en Cerro Largo, Rivera y Tacuarembó. Se seleccionaron cinco puntos de muestreo caracterizados previamente (Arocena et al., 2018) y un sitio nuevo seleccionado durante el muestreo, todos ellos considerando un gradiente en la intensidad del uso del suelo. Los arroyos vadeables conservan la nomenclatura designada en Arocena et al., (2018): C6, C4, M31, M35 y V7. El punto de muestreo añadido en este trabajo representa un sitio control y fue designado con el nombre del mismo arroyo: Ombú.

El Informe enmarcado en el convenio DINAMA-Facultad de Ciencias provee los antecedentes de la detección de pesticidas en músculo de peces para gran parte de los sitios de estudio (González-Bergonzoni et al., 2019). Los plaguicidas identificados bioacumulados en dicha

ocasión fueron acetoclor (V7), atrazina (V7, M35), azoxistrobina (V7), epoxiconazole (M35), piraclostrobin (V7, M35) y trifloxistrobin (M31, M35). El uso del suelo vinculado a la presencia de fitosanitarios en todos los casos fue el cultivo de soja, el cual continúa presente en las microcuencas seleccionadas. La cobertura del suelo durante el período entre la obtención de los antecedentes y el trabajo actual es conocida a través de las capas de cobertura del suelo generadas por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) para los años 2015, 2017/2018 y 2020/2021.

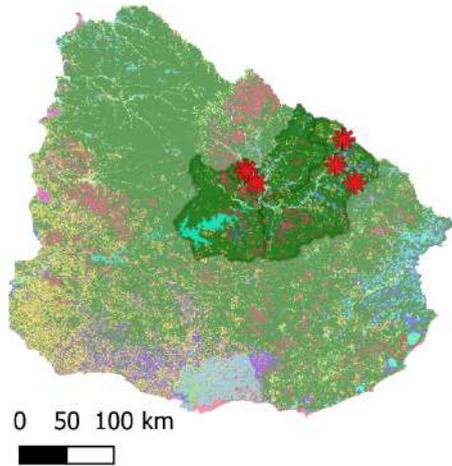
Fue necesario realizar un análisis comparativo del uso del suelo en las microcuencas entre una capa de cobertura de 2015 (datos provenientes del convenio DINAMA-Facultad de Ciencias), una de 2018 y posterior a la selección de los sitios y de la instancia de muestreo, una corrección de la última con la adición de forestación nueva lanzada en marzo de 2021 (ambas extraídas de la página oficial del MGAP). La actualización se realizó en el software QGIS 3.16.8, a través de la superposición y corte por capa máscara del ráster con la cobertura 2020/2021 y la capa de superficie de las microcuencas generada en 2015 (formato shapefile). Posteriormente, se combinaron las tablas de atributos de ambas fuentes y se recalculó el uso de suelo actual (cobertura 2020/2021) en la superficies de las áreas de interés (microcuencas de 2015). Uno de los sitios de muestreo, la cañada del Ombú, no formó parte del convenio DINAMA-Facultad de Ciencias por lo que su microcuenca se obtuvo mediante el dibujo de un polígono delimitado por líneas de altura del terreno posteriormente superpuesto a la capa de uso del suelo actual. En este caso los porcentajes de cada cobertura se generaron delimitando con nuevos polígonos coincidente con las categorías de la capa de uso del suelo 2020/2021.

Los sitios de muestreo considerados (C4, C6, M31, M35, Ombú y V7) fueron re-clasificados según el porcentaje de la cobertura del suelo actual (Tabla 1). Cada actividad productiva fue considerada relevante, arbitrariamente, cuando ocupó más del 20% de la superficie de la subcuenca. De tal forma se generaron tres categorías: “cobertura natural” o sitios control con <20% de actividades agrícolas (C4, M31 y Ombú), “agrícola bajo” con ~30% de superficie cultivada (V7) y “agrícola medio” con ~50% de la misma actividad (C6 y M35). Para generar dichas categorías se realizaron agrupamientos generales; de forma tal que la clase “cobertura natural” está formada por “campo natural”, “campo natural regenerado”, “arbustos” y “bosque nativo”. De la misma forma la categoría “agrícola” está formada por “agricultura de secano” (cultivos de verano) y “agricultura de cereal” (rastrojo de cultivo de invierno); mientras que “forestal” incluye a “bosque plantado” y “bosque plantado nuevo 2021”. El terreno cubierto por distintos cuerpos de agua (tajamares, represas para riego y arroyos) están agrupados en “aguas artificiales/naturales”.

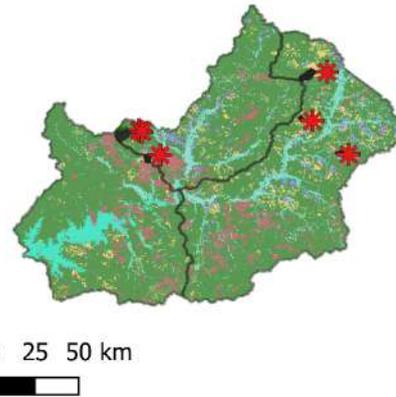
Área de estudio



Uruguay



Departamentos de muestreo
Cerro Largo, Rivera y Tacuarembó



Referencias

Sitios de muestreo

* Sitio

Usos del suelo 2021

■ Campo natural ■ Cuerpos de agua
■ Agricultura ■ Forestal

Subcuencas de interés

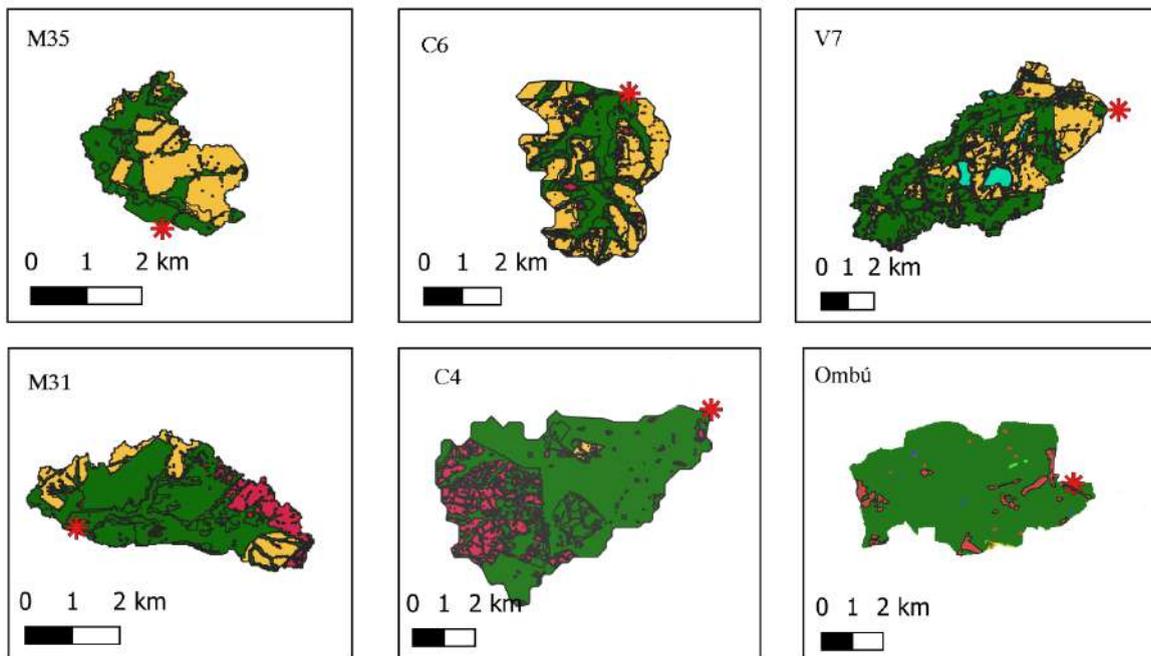


Figura 1. Sitios de muestreo con sus respectivos usos del suelo actualizados al año 2021.

Tabla 1. Porcentaje de cada uso del suelo 2020/2021 para los sitios de muestreo.

Sitio	Cobertura agrícola (%)	Cobertura forestal (%)	Cobertura natural (%)	Clasificación
C4	0,3	12,7	87	Natural
M31	15,3	11,5	73,2	Natural
OMBÚ	-	-	100	Natural
V7	30,9	-	62,6	Agrícola bajo
C6	48,3	-	49,8	Agrícola medio
M35	48,5	-	51	Agrícola medio

Obtención y procesamiento primario de las muestras

La instancia de muestreo tuvo lugar a finales de marzo de 2021 durante dos días, de forma que coincidió con la época de comienzo de cosecha de cultivos de soja y posterior a abundantes lluvias. Es relevante mencionar que previamente a la cosecha, durante las etapas de floración y maduración fisiológica de la soja, es el momento en que se realiza la mayor parte de las aplicaciones de fitosanitarios debido a la prevención y tratamiento de las enfermedades de fin de ciclo (Anexos 2, 3; Ivancovich 2018).

En la extracción de los peces se utilizó una red de arrastre de 5 x 1.5 m y de 5 mm de apertura de malla, con la que se muestrearon los distintos microambientes del arroyo vadeable. La cantidad de pasadas de red varió entre los sitios según la cantidad de individuos que se obtuvieron en cada una. Se procuró un mínimo de quince peces de *B. iheringii* y *C. interruptus*, mientras que los individuos de otras especies fueron devueltos al agua en el momento. Las muestras fueron conservadas dentro de tubos falcon etiquetadas e inmersas en hielo hasta el acceso a un congelador de uso cotidiano (~18 °C).

En una primera instancia, se realizó la confirmación de la identidad de las especies, la cuantificación de individuos y la obtención de medidas de largo y peso totales de toda la muestra. Luego se seleccionaron en promedio 10 ejemplares representativos de ambas especies y de cada sitio para llevar a cabo el análisis completo (disección y cuantificación de pesticidas). Las disecciones de las muestras semi-congeladas fueron hechas bajo lupa Nikon SMZ245 para la extracción de las gónadas, el hígado y en algunos casos de grasa visceral; así como también para la búsqueda de parásitos externos e internos. El material necesario y las instalaciones fueron provistas por el Polo de Ecología Fluvial del Departamento del Agua (Centro Universitario Litoral Norte, sede Paysandú, Udelar).

Por motivos externos al equipo de trabajo, las muestras ya diseccionadas y procesadas de cuatro de los seis sitios perdieron la cadena de frío durante un tiempo prolongado, quedando en mal estado e inutilizadas para el análisis de bioacumulación de pesticidas. Las muestras correspondientes a dos sitios, viables y sin procesar, uno agrícola bajo y otro natural (V7 y OMBÚ) se encontraban almacenados en un lugar diferente, por lo cual no perdieron la cadena

de frío y se procesaron de la forma ya descrita pero en mayor cantidad, siendo un total 15 individuos por especie y por sitio.

Análisis de estado de salud de *B. iheringii* y *C. interruptus*

En esta etapa fue necesario trabajar paralelamente con dos conjuntos de datos, uno para cada especie. A partir de las medidas de talla de todos los individuos, discriminados únicamente por especie, se obtuvieron el rango y promedio de tamaños y pesos. Además, debido al mayor número de casos, se usó esta base de datos para el cálculo del coeficiente de alometría “b” (coeficiente de crecimiento alométrico), que es imprescindible en la posterior determinación del factor de condición corporal (K). El valor de dicho factor se corresponde con la pendiente de la linealización mediante logaritmo para la relación entre el peso y el largo de los individuos.

Durante las disecciones se registraron diez variables. En cuanto a la evaluación del estado de salud general de los individuos se evaluaron la presencia de malformaciones (categoría binaria: sí o no), la presencia de parásitos internos (categoría binaria: sí o no, visualizados en forma de quistes) y la intensidad de infección por tremátodos (particularmente de los causantes de *black spot disease*, determinado por la cantidad de puntos negros). El resto de las variables obtenidas fueron el largo estándar (cm; medidos desde la boca hasta el pedúnculo caudal), peso total (g), peso de grasa visceral (g), peso del hígado (g), sexo (macho o hembra), peso de las gónadas (g) y peso eviscerado (g). Los índices hepatosomático (I_h) y gonadosomático (I_g) fueron calculados como el peso del órgano (hígado o gónadas) sobre el peso eviscerado, multiplicado por un factor de 100. Con el fin de reducir la incertidumbre del análisis de desarrollo gonadal y hepático, se utilizaron únicamente las hembras en ambas especies. El cálculo del factor de condición corporal (K) se reduce al cociente entre el peso eviscerado y el valor del producto del largo corporal y el coeficiente de crecimiento alométrico, multiplicado por un factor de 100. Además, se obtuvieron los porcentajes de prevalencia de parasitismo externo (presencia de puntos negros) e interno (presencia de quistes). Las fórmulas explícitamente utilizadas fueron obtenidas de Moreno (2019):

$$I_h = \left(\frac{\text{peso hígado (g)}}{\text{peso corporal (g)}} \right) \times 100$$

$$I_g = \left(\frac{\text{peso gónadas (g)}}{\text{peso corporal (g)}} \right) \times 100$$

$$K = 100 \times \frac{\text{peso (g)}}{\text{longitud total}^b \text{ (cm)}}; \quad b = \frac{\Delta \log(\text{peso (g)})}{\Delta \log(\text{largo (cm)})}; \quad \text{siendo } \Delta \text{ la diferencia entre el mayor y el menor valor obtenido de pesos o largos para cada especie.}$$

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software RStudio y consistieron en la realización de modelos lineales mixtos (LME) para el análisis de varianza (ANOVA) de cada variable normal y de varianza homogénea con respecto a las categorías de uso del suelo y del sitio de muestreo. Al momento de evaluar la existencia de diferencias significativas entre variables para distintas categorías de uso del suelo se introdujo un efecto aleatorio sobre el sitio. Aquellas con distribución no normal pero de varianzas homogéneas fueron analizadas

con el test no paramétrico de Kruskal Wallis. En los casos que los datos obtenidos no cumplieran con ninguno de estos dos supuestos necesarios y se trate de variables con poca cantidad de datos, los resultados se describieron cualitativamente por lo que carecen de significancia estadística.

Cuantificación de residuos de pesticidas

En vista del segundo objetivo específico, fue necesaria la colaboración con personal perteneciente al Departamento de Desarrollo Tecnológico (DDT, Centro Universitario Regional Este, sede Rocha, UdelAR). Se utilizó la metodología QuEChERS (Colazzo et al., 2019) para la detección de residuos de pesticidas (protocolo en Anexo 4) para un total de 38 compuestos, entre los que se encuentran tanto principios activos como productos de degradación. A grandes rasgos, se dirigió el análisis hacia el grupo de insecticidas organoclorados, organofosforados y piretroides; así como también hacia herbicidas y fungicidas de uso actual. La totalidad de los compuestos se hallan detallados en el Anexo 5.

Para el análisis fue necesario realizar la extracción de los residuos de pesticidas desde las muestras homogeneizadas (versión sin buffer) (Colazzo et al., 2019), seguida por la identificación de los compuestos con 1) una cromatografía de gas en combinación con una espectrometría de masas (GC-MS) y 2) una cromatografía líquida en combinación con una espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Las cromatografías son métodos que permiten separar individualmente a los solutos que forman mezclas complejas (fase móvil del sistema) a través del paso de una serie de disolventes que alteran la afinidad entre dichos compuestos (analitos) con la matriz experimental (fase estacionaria del sistema).

La utilización de la cromatografía de gases (GC) permite obtener los compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles, mientras que la cromatografía líquida (LC) separa a aquellos no volátiles (Gutiérrez & Droguet, 2002). El resultado de una cromatografía es un cromatograma, una representación gráfica que revela los distintos tiempos en los que cada analito eluyó del sistema, visualizados en forma de picos acentuados o bandas discretas. La cuantificación de los pesticidas se obtiene integrando el área debajo de dichos picos, utilizando una curva de calibración generada con el mismo tipo de muestra a analizar y la medida del estándar de control interno (compuesto de concentración e identidad conocidas). El nivel de detección para los fitosanitarios en este trabajo se encuentra por debajo de las partes por billón (ppb), siendo de 1 µg/kg. Con el fin de identificar a qué compuesto corresponde cada tiempo de migración es necesario un análisis de los mismos a través de una espectrofotometría de masas (MS) (Gutiérrez & Droguet, 2002). Esta técnica se basa en la ruptura del analito puro a través de ionización, lo cual provoca la separación de iones con masa y cargas determinadas en un patrón que corresponde al espectro de masas de la molécula. Tanto el tiempo de elución como el espectro de masas son únicos y conocidos para cada residuo de fitosanitario analizado (Gutiérrez & Droguet, 2002). El manual SANTE (European Commission, 2015) establece cuáles combinaciones de ambas variables identifican a cada compuesto, así como el nivel de error de solapamiento permitido de los picos de detección de los analitos analizados con los picos dictados en la bibliografía (Colazzo et al., 2019).

Las muestras destinadas a la detección de fitosanitarios pertenecían al sitio agrícola medio V7 y al sitio control Ombú, con una cantidad total de sesenta individuos (previamente eviscerados), siendo quince de cada especie y de cada punto de muestreo. Fue necesaria la

agrupación de los organismos en grupos de 10 g, puesto que es el peso de muestra establecido y válido para la metodología utilizada (Colazzo et al., 2019). De esta forma se obtuvieron un total de seis cuantificaciones; para *B. iheringii* dos provenientes de V7 y dos de Ombú y para *C. interruptus* una muestra de V7 y otra de Ombú. El blanco para la construcción de una curva de calibración se conformó cinco muestras de peces de ambas especies que no fueron utilizados en la obtención de las variables de interés. Todas las muestras se homogeneizaron congeladas en mortero. Se realizó el mismo tratamiento para las seis muestras a cuantificar, las cinco muestras blanco y para el control negativo de los reactivos y equipos. El control positivo es la adición de compuestos estándares en cada muestra.

Extracción y purificación

Esta etapa se realizó en las instalaciones del CURE Rocha, y todas las manipulaciones que involucran reactivos fueron hechas en una cabina de flujo laminar vertical con el fin de asegurar esterilidad. Durante la extracción se genera la separación entre los restos tisulares y un extracto con los residuos de pesticidas y el contenido lipídico (Figura 2A). Para ello fue necesario agregar 10 ml del solvente acetonitrilo (ACN) al homogeneizado de pez. Seguidamente se adicionaron 1.5 g de cloruro de sodio (NaCl) y 4 g de sulfato de magnesio (MgSO₄) que fueron integrados a la muestra por agitación manual durante un minuto. Luego de mezcladas las sales se agregaron 10 mg/ml del compuesto estándar interno de trifenil fosfato (TPP) y se procedió a centrifugar durante cinco minutos a 4000 rpm.

La purificación de los extractos se realizó con el fin de eliminar el mayor contenido grasa disuelto posible, a través de los reactivos PSA y C-18. Para ello se transfirió una alícuota de 7 ml del sobrenadante del centrifugado a un tubo falcon de 15 ml con una mezcla de 150 mg de PSA, 180 mg de C-18 y 1 g de MgSO₄. El contenido fue homogeneizado en un vórtex durante al menos 30 segundos y nuevamente centrifugado a 4000 rpm durante cinco minutos.

Análisis por LC-MS/MS y GC-MS

El sobrenadante obtenido a partir de la purificación se destinó a dos sets de muestras para la cuantificación de los residuos de plaguicidas. Se almacenó a -20 °C 1 mL en un vial de vidrio de 2 mL, para enviar a realizar el análisis de LC-MS/MS en Paysandú. Otros 4 mL fueron transferidos a nuevos tubos falcon de 15 mL y evaporados con un flujo de nitrógeno gaseoso constante, en baño maría a baja temperatura, hasta deshidratarlos totalmente (Figura 2B, 2C). Las muestras volvieron a disolverse en 1 mL de bromofos metilo para el análisis GC-MS en Rocha. La cantidad de tejido equivalente a los extractos generados fueron de 1 g para LC-MS/MS y 4 g para GC-MS.

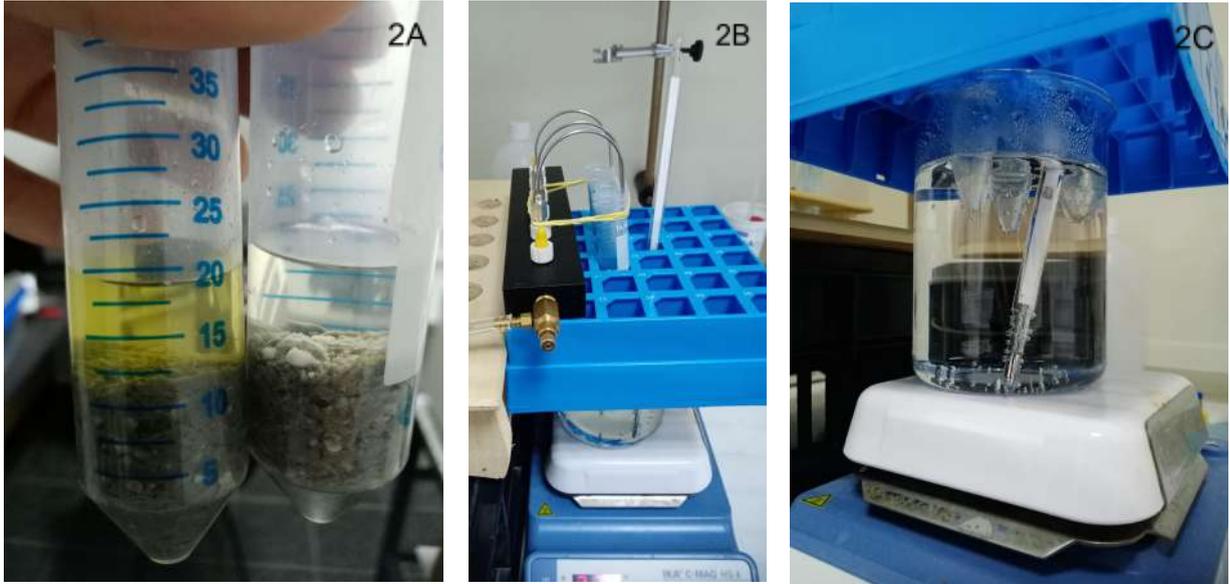


Figura 2. A) Muestras con distinto contenido lipídico y restos tisulares, posterior a la extracción y previo a la purificación del extracto. B) Etapa de deshidratación de tres muestras purificadas, parte superior del sistema compuesto por la conexión y vía de la fuente de nitrógeno gaseoso. C) Etapa de deshidratación de tres muestras purificadas, parte inferior del sistema compuesto por un baño maría que mantiene la temperatura ambiente.

Resultados

Detección de pesticidas

El análisis de detección de fitosanitarios reveló la presencia del insecticida cipermetrina en niveles no cuantificables ($<1 \mu\text{g}/\text{kg}$) y del fungicida azoxistrobina en una concentración de $10.3 \mu\text{g}/\text{kg}$, ambos en el sitio con cobertura natural Ombú y únicamente en la especie *B. iheringii*. Para *C. interruptus* no se detectaron plaguicidas bioacumulados en ninguna muestra.

Malformaciones

En ningún individuo se observaron malformaciones evidentes.

Infección parasitaria

La inspección visual reveló tres parasitosis distintas. Una de ellas fue exclusivamente externa, reconocida como puntos negros dispersos e individuales en la piel (Figura 3A) y no detectables en la cara interna del músculo. Las parasitosis internas resultaron ser de dos clases claramente distinguibles; una de ellas formó quistes blancos y de forma variable que se encontraron entre los órganos viscerales y reproductivos (Figura 3B), mientras que la otra clase formó quistes negros y esféricos asociados a la cara interna del músculo (Figura 3C). Todos los organismos que mostraron puntos negros estaban parasitados internamente, aunque no todos aquellos con algún tipo de quiste los reflejó en el exterior. Se considera a la prevalencia como el porcentaje de casos en el estado de parasitado, y a la intensidad como a la cantidad de puntos negros contados. Los datos obtenidos no cumplieron la normalidad de los residuales ni con la homogeneidad de varianzas, por lo que la descripción se realizó sin respaldo estadístico. Los quistes internos no fueron contabilizados.

En general, *C. interruptus* tuvo menor prevalencia e intensidad de parasitosis que *B. iheringii*. No existe diferencia significativa entre la clase de uso del suelo, pero sí esta variable fue altamente dependiente del lugar de muestreo. Los sitios agrícola bajo V7 y natural Ombú tuvieron mayores niveles de parasitosis para ambas especies.

C. interruptus mostró una prevalencia de quistes blancos mayor en el punto natural Ombú, con un 27% de esa población infectada, y en el punto agrícola bajo V7 con un 20%. Le siguen el sitio natural C4 y el agrícola medio M35 con un 12.5% y 10%, respectivamente. En los sitios agrícola medio C6 y control M31 no se observaron quistes blancos internos. Los puntos negros se observaron sólo en Ombú y V7, con prevalencias de 6.7% y 13.4% y muy baja intensidad, siendo dos la cantidad máxima de puntos por pez. En esta especie no se hallaron quistes negros.

B. iheringii presentó un 100% de quistes blancos en los sitios agrícola bajo V7 y natural M31, mientras que en el sitio control Ombú fue un 53.5% y en el agrícola medio C6 fue sólo de un 7.7%. En el sitio control C4 no se detectaron. Los puntos negros estuvieron presentes en el 93.3% de los individuos y con intensidades entre 0 y 70 puntos por pez en V7, y en Ombú estuvo el 100% de los organismos infectados con máximos de 16 puntos. Los quistes negros estuvieron presentes sólo en OMBÚ con una prevalencia del 46% y no fueron contabilizados.

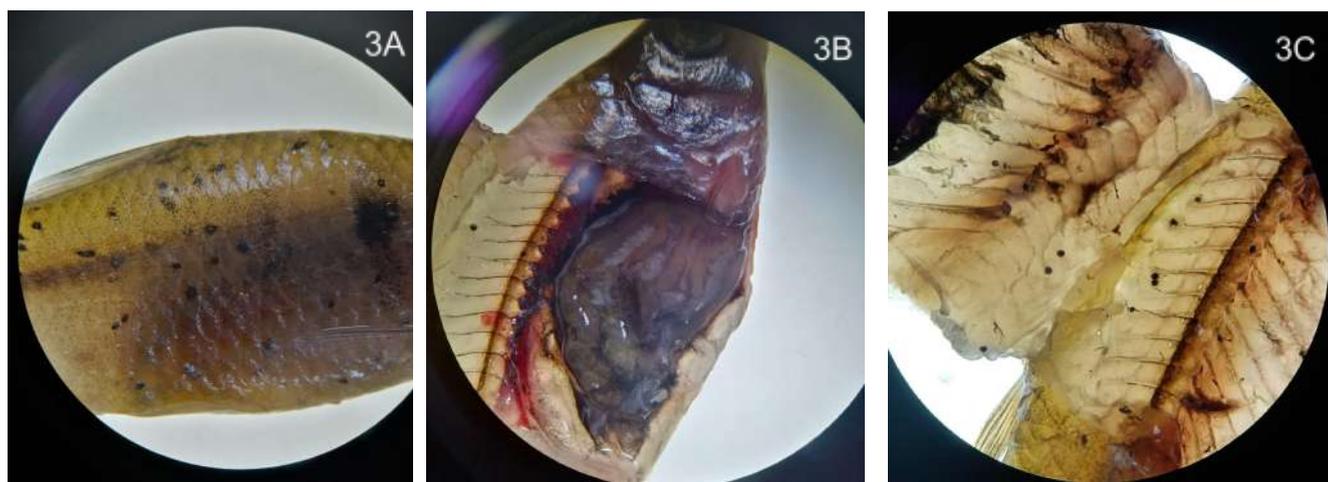


Figura 3. Parasitosis vistas en lupa de A) puntos negros, B) quistes blancos y C) quistes negros.

Análisis de *Bryconamericus iheringii*

Colecta

La especie *B. iheringii* (Figura 4A, 4B) fue encontrada en cinco de los seis sitios de muestreo, estando ausente en el agrícola medio M35. En los demás sitios impactados, C6 y V7, tuvo buena representación, obteniéndose 49 y 93 individuos en cada cual. En C4, M31 y OMBÚ se recuperaron 11, 23 y 40 individuos, respectivamente.



Figura 4. A) Individuo adulto de ~ 4 cm y B) Individuo juvenil ~2.5 cm; colectados durante el muestreo de la tesina.

Talla y condición corporal

La relación entre la longitud y el peso de la especie reveló un crecimiento alométrico con un coeficiente (b) de 2.93. Los tamaños y pesos promedio se detallan en la Tabla 2. La distribución de las longitudes corporales se encuentra en el Anexo 6.

Los lugares con el largo máximo fueron el sitio impactado C6 y el control C4, con 6.0 cm. El mayor tamaño promedio fue obtenido en C6 con 4.23 cm mientras que en los demás puntos de muestreo dicho valor oscila entre 3.4 cm y 3.75 cm. El largo promedio menor se halló en el control M31 con 3.4 cm. El tamaño mínimo se encontró en el sitio agrícola bajo V7 con 2.2 cm. Con respecto al rango de tallas máximas y mínimas; no existió evidencia de ausencia de categorías de talla específicas. Las longitudes mayores (> 5.7 cm) estuvieron presentes en todas las subcuencas salvo la de cobertura natural M31 mientras que las menores (< 2.5 cm) estuvieron presentes sólo en V7. El mayor rango fue obtenido en V7, donde se encontró una

diferencia mayor a 3.5 cm y a 4.5 g entre el individuo más y menos grande. Para los demás sitios, dichas diferencias oscilan entre los 2.7 y 2.9 cm y entre 3.5 y 4.3 g.

Los rangos de longitudes corporales fueron significativamente diferentes entre los sitios de muestreo (Kruskal Wallis test, p-valor 0.0011). De la misma forma, el análisis según el uso del suelo fue significativo, dado que los impactos agrícola bajo y agrícola medio fueron representados por un sitio cada uno (Kruskal Wallis test, p-valor 0.0012).

La condición corporal no reveló diferencias significativas según el uso del suelo en las microcuencas (ANOVA: F 1.039; p-valor 0.49). En el caso de la comparación sitio a sitio, sí se observan diferencias (ANOVA: F 2.693 p-valor 0.039), siendo menor en la cuenca natural C4 y mayores en las subcuencas natural Ombú y agrícola bajo V7. Los K obtenidos se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Rangos, promedios de tamaños y pesos totales, condición corporal y cantidad de individuos colectados (N) de *B. iheringii*

Sitio/Medida	Largo min - máx (cm)	Largo promedio (cm)	Peso min - máx (g)	Peso promedio (g)	Condición corporal (K)	N
C4	3.2 - 6.0	3.75	0.75 - 5.03	1.45	1.04	11
M31	2.7 - 5.4	3.4	0.44 - 3.99	1.02	1.11	23
OMBÚ	2.9 - 5.8	3.67	0.51 - 4.83	1.35	1.17	40
C6	3.2 - 6.0	4.23	0.63 - 4.91	1.88	1.08	49
V7	2.2 - 5.8	3.52	0.29 - 5.04	1.2	1.18	93

Contenido de grasa visceral

En general, fue posible extraer grasa visceral en cantidades cuantificables (Figura 7). El sitio agrícola bajo V7 obtuvo el mayor promedio con 0.0237 g. Le siguen los sitios naturales M31 con 0.0181 g y Ombú con 0.0158 g. Por último, el peso promedio recuperado en el agrícola medio C6 fue de 0.0071 g y en el control C4 0.0045 g. Existieron diferencias significativas de la cantidad de grasa visceral recuperada entre los individuos provenientes de distintas microcuencas (Kruskal Wallis test, p-valor 0.01043) siendo mayor en el sitio agrícola bajo V7.

Índices gonadosomático y hepatosomático

Para la especie *B. iheringii*, se halló un mayor desarrollo gonadal en los sitios C6, Ombú y V7 dados por la visualización de huevos en formación (Figura 5A, 5B), que se corresponden con pesos promedios de 0.0547 g, 0.0311 g y 0.0213 g, respectivamente. En los sitios C4 y M31 no se encontró un desarrollo gonadal significativo (Figura 7).

El índice gonadosomático tomó valores de entre 0.38 y 9.4 para hembras y 0.21 y 0.93 para machos. Los índices promedios, calculados únicamente para hembras, fueron de 2.92 en C6, 1.61 para Ombú, 1.44 en C4, 0.987 en V7 y finalmente 0.87 en M31. Los datos generados

con respecto al índice gonadosomático (Figura 6A) no cumplieron con los supuestos de normalidad ni de homogeneidad de varianzas necesarios para realizar un ANOVA. Sin embargo, se destaca la presencia de datos outliers en el sitio agrícola C6, por lo cual tuvo mayor dispersión de datos y mayor índice promedio con respecto a los demás sitios.



Figura 5. A) Individuo proveniente de C6 con la totalidad de las gónadas extraídas. B) Fotografía de huevos en estado de desarrollo avanzado con un peso total de ~ 0.257 g.

En general, el peso promedio del hígado recuperado fue similar entre los sitios de muestreo siendo los valores máximo y mínimo de 0.01 g y 0.018 g. Los valores del índice hepatosomático (Figura 6B) obtenidos fueron de 1.17 en M31, 1.00 en Ombú, 0.83 en V7, 0.74 en C4 y 0.55 en C6. El ANOVA para dicha variable analizado entre las subcuencas, no mostró diferencias estadísticamente significativas ($F 1.352$; p -valor 0.2628). Sin embargo, se distinguen claras diferencias en el sitio agrícola C6, el cual obtuvo menor dispersión de datos y menor índice promedio con respecto a los demás sitios.

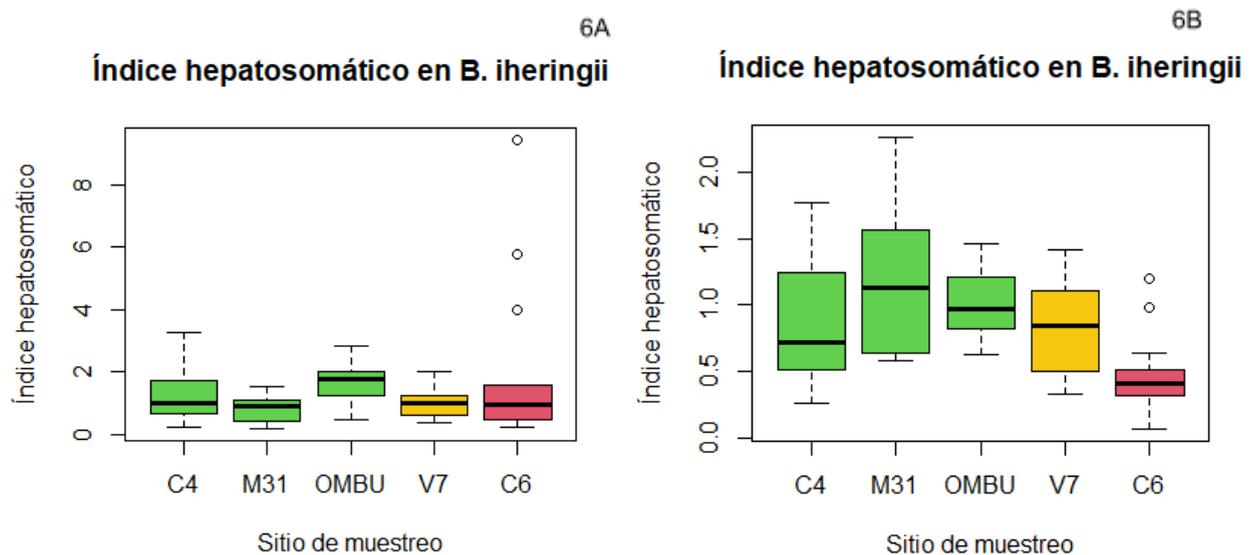


Figura 6. Boxplot de la dispersión de A) índices gonadosomáticos y B) índices hepatosomáticos, ambos obtenidos para *B. iheringii*. En ambos gráficos se presentan los sitios en gradiente de actividad agrícola y los colores conciden con el uso del suelo, de forma que los sitios control están indicados en verde y los agrícolas bajo y medio están en amarillo y rojo respectivamente.



Figura 7. Individuo representativo obtenido del sitio control Ombú; en orden de izquierda a derecha aparecen extraídos el hígado (rojo, ~0.018 g), la grasa visceral (amarillo, ~0.029 g) y las gónadas lejos del estado reproductivo (negro, ~0.0042 g) extraídas.

Análisis de *Cheirodon interruptus*

Colecta

C. interruptus (Figura 8) estuvo presente en todas las subcuencas y obtuvo mayor abundancia en las agrícolas medio C6 y M35 con 58 y 36 individuos respectivamente mientras que en V7 y los sitios control se obtuvieron entre 8 y 20 organismos.



Figura 8. Individuo de *Cheirodon interruptus* adulto de ~ 4 cm

Talla y condición corporal

La relación entre la longitud y el peso de la especie reveló un crecimiento alométrico con un coeficiente (b) de 3.46. Dicho resultado indica que los organismos crecen ligeramente más rápido en largo que en peso. Las tallas promedio se detallan en Tabla 3. La distribución de las longitudes corporales se encuentra en el Anexo 6.

En la especie *C. interruptus* los tamaños extremos fueron de 2.5 cm para el largo mínimo en el sitio agrícola medio C6 y 4.8 cm para el máximo en el lugar impactado M35. El mayor tamaño promedio se obtuvo en el sitio control M31 con 4.02 cm, mientras que los demás oscilaron entre 3.15 cm y 3.71 cm. Se registraron categorías de tamaños corporales ausentes en la mayoría de los sitios. Las longitudes mayores (> 4.5 cm) sólo estuvieron presentes en el sitio agrícola medio M35 mientras que las menores (< 2.8 cm) estuvieron presentes en V7 y C6. La mayor variabilidad de longitudes corporales fue obtenida de M35. En general, los organismos obtenidos de lugares con cobertura de campo natural (C4, M31 y Ombú) revelaron una mayor homogeneidad de tallas corporales.

La condición corporal analizada mediante un ANOVA no mostró diferencias significativas entre sitios con distinto uso del suelo (F 0.5299; p-valor de 0.6352). Los valores promedio se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Rangos, promedios de tamaños y pesos totales, condición corporal y cantidad de individuos colectados (N) de *C. interruptus*

Sitio/Medida	Largo min - máx (cm)	Largo promedio (cm)	Peso min - máx (g)	Peso promedio (g)	Condición corporal (K)	N
C4	3.4 - 4.0	3,71	0,96 - 1.54	1.23	2.4	8
M31	3.8 - 4.2	4.02	1.47 - 2.11	1.7	2.6	10
OMBÚ	2.9 - 3.8	3.27	0.64 - 1.5	0.94	2.6	17
C6	2.7 - 4.0	3.28	0.44 - 1.51	0.78	2.2	58
M35	3.1 - 4.8	3.69	0.81 - 3.22	1.53	2.7	36
V7	2.5 - 3.8	3.15	0.35 - 1.47	0.74	2.2	20

Contenido de grasa visceral

En general no fue posible recuperar grasa visceral de *C. interruptus*. Sólo se obtuvieron pesos de entre 0.0012 g y 0.0014 g en los sitios control M31 y C4 respectivamente.

Índices gonadosomático y hepatosomático

En *C.interruptus*, se constató la presencia de gónadas en un avanzado estado de desarrollo en el sitio agrícola medio M35 con un peso promedio de 0.187 g (Figura 9A). Los siguientes sitios con gónadas de mayor biomasa fueron los controles C4 con un promedio de 0.029 g (Figura 9B) y M31 con 0.025 g. Los demás sitios no tenían las huevas en formación distinguibles. Los valores del índice gonadosomático (Figura 10A) para las distintas subcuencas son 5.6 para M35, 2.5 para C4, 2.3 para Ombú, 1.8 en V7 y C6 y 1.7 en M31. Los datos obtenidos no cumplen con los supuestos estadísticos necesarios para realizar un ANOVA.

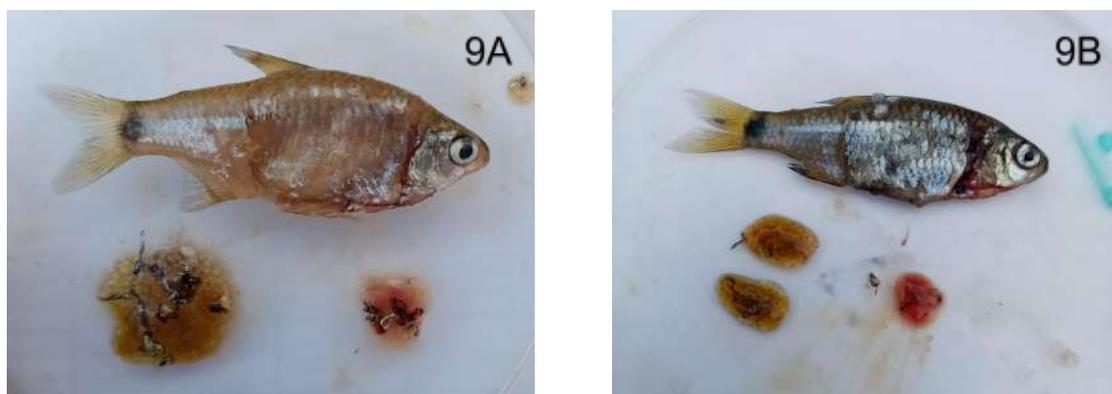


Figura 9. Gónadas desarrolladas (amarillo) e hígado (rojo) extraídos de individuos *C. interruptus* de A) sitio agrícola medio M35 y B) sitio control C4.

Los datos de peso del hígado varían entre 0.005 y 0.031 g, siendo mayor en los sitios agrícolas medio M35 y C6. Los índices hepatosomáticos promedio (Figura 10B) toman valores de 1.5 en M35, 0.9 en C6, 0.9 en Ombú, 0.8 en M31, 0.7 en V7 y 0.6 en C4. El ANOVA realizado no demostró diferencias significativas entre los impactos (F 1.2466, p-valor 0.2533) y entre sitios no fue posible realizarlo debido a varianzas no homogéneas. Para *C. interruptus*, los índices hepatosomáticos siguen un patrón similar al de los índices gonadosomáticos, siendo el sitio agrícola medio M35 el de mayor promedio.

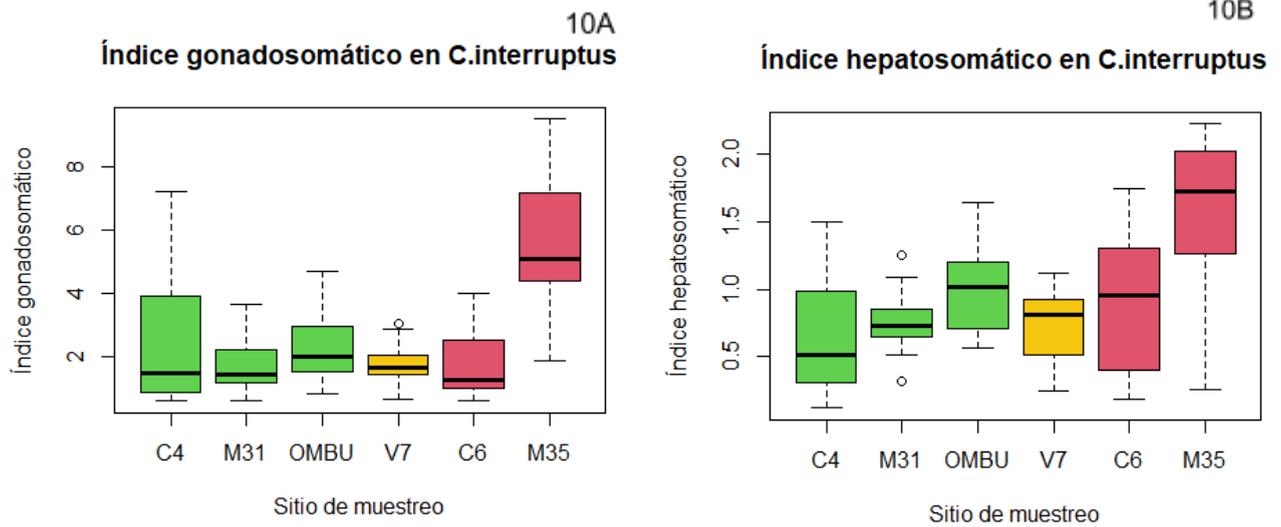


Figura 10. A) Boxplot de los índices gonadosomáticos y B) Boxplot de los índices hepatosomáticos; ambos obtenidos para *C. interruptus*. En ambos gráficos se presentan los sitios en gradiente de actividad agrícola y los colores condicen con el uso del suelo, de forma que los sitios control están indicados en verde y los agrícolas bajo y medio están en amarillo y rojo respectivamente

Discusión

Predicción 1.

Será posible detectar residuos de pesticidas en el músculo de los organismos que habitan contiguo a áreas cultivadas con soja y no en las subcuencas naturales.

Los resultados obtenidos del análisis de bioacumulación de plaguicidas no concuerdan con la predicción planteada inicialmente; siendo detectados el insecticida cipermetrina y el fungicida azoxistrobina en el sitio control Ombú. La cipermetrina es un insecticida piretroide utilizado para el control de plagas de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera y Hemiptera en cultivos de secano y también se extiende en usos domésticos para la eliminación de ectoparásitos en caninos, bovinos, ovinos, porcinos y equinos. En Uruguay se comercializan sin receta profesional en formulación de concentrados emulsificables o en polvos secos (MGAP, consulta web). El principio activo tiene una volatilidad nula o baja, una solubilidad en agua baja, una persistencia en el suelo y capacidad de bioacumulación entre media y alta dado un Kow de 6.6 (European Commission, consulta web). Además, se encuentra catalogada como R50 (alta toxicidad en peces) y R53 (puede causar efectos a largo plazo en el ambiente acuático), siendo la etiqueta de peligrosidad amarilla. Los estudios han confirmado capacidad de disrupción endocrina de categoría 2, genotoxicidad positiva reflejada en aberraciones cromosómicas y cambios patológicos en el hígado. El valor de CL50 (concentración letal 50) en la trucha arcoiris (European Commission, consulta web), que define una toxicidad aguda extrema en peces es de 0.69 µg/L. Por su parte, la azoxistrobina es un fungicida de la familia de las estrobilurinas de uso frecuente en cultivos varios tales como soja, trigo, cebada y arroz. Actualmente se comercializan como granulados dispersables en agua o en una suspensión concentrada (MGAP, consulta web). Se caracteriza por una volatilidad nula o baja, una solubilidad en agua baja, una persistencia en el suelo media y una capacidad de bioacumulación ligera con un Kow de 2.5 (European Commission, consulta web). Al igual que la cipermetrina, se encuentra catalogada como R50 y R53 aunque la etiqueta de peligrosidad es verde. La toxicidad es especialmente alta en peces, siendo la CL50 de 470 µg/L. Los efectos comprobados son de leve mutagenicidad positiva (European Commission, consulta web).

La batería de pesticidas hallados en esta ocasión y los antecedentes de detección registrados por González-Bergonzoni et al., (2019) para los sitios de muestreo, junto a los cambios de cobertura de las subcuencas, se resumen en la Tabla 4. Una de las conclusiones extraídas de González-Bergonzoni et al., (2019) fue que la frecuencia de detección de plaguicidas disminuye a medida que lo hace la presencia de actividades agro-forestales. Es así que en subcuencas agrícolas intensivas la presencia de fitosanitarios fue de un 82%, en cuencas agrícolas medias un 66% y en entornos forestales o agroforestales entre un 40 y 50%; mientras que en sitios con cobertura natural es sólo del 16%; por lo que la probabilidad de detectar fitosanitarios en V7 y Ombú era como máximo según ese antecedente, de un 66%. La disminución de la superficie destinada a la agricultura en V7 ocurrida desde dicho análisis, además del uso de distintas especies de peces, son factores que podrían también explicar la ausencia de detecciones de fitosanitarios en el sitio impactado en este trabajo. Las muestras utilizadas en los antecedentes de detección de plaguicidas fueron obtenidas entre mayo y junio de 2015, con un 56% de la microcuenca cultivada (lo cual representa un 26% más de superficie que la destinada actualmente a agricultura). Además, previamente se utilizaron

especies de mayor tamaño y posición trófica: *Gymnogeophagus rhabdotus*, *Hoplias malabaricus*, *Oligosarcus jenynsii* y *Rhamdia quelen*. Dicho cambio es especialmente relevante ya que *Bryconamericus iheringii* y *Cheirodon interruptus* son carácidos de hábitos alimenticios que oscilan entre el consumo de materia orgánica y de invertebrados, por lo cual la exposición a fitosanitarios a través de la dieta es menor que en los grupos tróficos de carnívoros/piscívoros (*Hoplias malabaricus*, *Rhamdia quelen*), carnívoros generalistas (*Oligosarcus jenynsii*) y omnívoros de mayor tamaño (*Gymnogeophagus rhabdotus*) (Barbosa et al., 2003; Beltran et al., 2011). De esta forma, el análisis en González-Bergonzoni et al., (2019) posiblemente integró tanto la vía de exposición directa como la correspondiente de la ingesta. No menos relevante es el tamaño corporal de las especies utilizadas, siendo de menor porte ambas mojaras. Existe evidencia de una correlación positiva entre la bioacumulación de fitosanitarios y las tallas corporales; puesto que mayores longitudes suelen indicar también mayor edad, tamaño de las presas en la dieta y contenido lipídico en los organismos dentro de una misma especie (Burreau et al., 2006; Yu et al., 2012). Además, las vías de eliminación de contaminantes están vinculadas a la eficiencia del metabolismo de excreción, el cual se enlentece a medida que aumenta el tamaño corporal de forma tal que aquellos peces de mayor talla depuran más lentamente los residuos de plaguicidas (LeBlanc 1995; Yu et al., 2012).

En cuanto a los fitosanitarios detectados en la tesina, cabe mencionar que el punto de muestreo Ombú es contiguo a una vivienda rural y cuenta con ganado de tiene libre acceso al curso de agua. Además, por fuera de la microcuenca delimitada y en un radio de unos 10 km, se rodea por forestación plantada a nuevo en 2020-2021. Ambos hechos pueden explicar la detección de plaguicidas allí. La cipermetrina es ampliamente utilizada y comercializada como solución doméstica contra el ingreso de insectos y demás artrópodos a la vivienda y contra la prevalencia de ectoparásitos en los animales. Un uso doméstico reiterado y en grandes cantidades, así como también la presencia de ganado expuesto a dicho fitosanitario, pueden actuar como focos de contaminación para el curso de agua. Particularmente, se ha demostrado el aporte de insecticidas a través de materia orgánica proveniente de las heces, tanto por transporte aéreo y escorrentía como por deposición dentro del agua (Boxall et al., 2004; Khan et al., 2008; Peterson et al., 2020). Con respecto a la presencia de azoxistrobina, si bien es utilizada frecuentemente en el ámbito de la agricultura también es aplicada en plantaciones forestales y ya ha sido detectada en matrices biológicas en Uruguay utilizando QuEChERS (Niell et al., 2015). La presencia de ambos compuestos en *B. iheringii* y no así en *C. interruptus* podría estar vinculado a la composición lipídica en el tejido de los organismos, siendo la primera especie la única con contenido graso recuperable durante la disección y con extractos teñidos de amarillo durante el análisis de residuos de QuEChERS. El contenido lipídico disperso entre el tejido muscular ha demostrado una correlación positiva con la bioacumulación de compuestos apolares (lipofílicos) (Deribe et al., 2011; Tadokoro & Tomita 1987).

Tabla 4. Detección y cuantificaciones de plaguicidas reportados en González-Bergonzoni et al., (2019) y los obtenidos en el análisis con las muestras de la tesina. El límite de cuantificación (LQ) está establecido en 1 µg/kg. na: no analizado; nd: no detectado.

Sitio_Año	Especie	A c e t o c l o r	A t r a z i n a	A z o x i s t r o b i n a	C i p e r m e t r i n a	E p o x i c o n a z o l e	P i r a c l o s t r o b i n	T r i f l o x i s t r o b i n	T o t a l	Uso del suelo
2015										
C4	Sin análisis									-
M31	<i>G. rhabdothus</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<LQ	1	Agrícola medio - 52% cultivo
OMBÚ	Sin análisis									-
V7	<i>R. quelen,</i> <i>H. malabaricus</i>	1.3	<LQ	<LQ	nd	nd	<LQ	nd	4	Agrícola medio - 56% cultivo
C6	<i>O. jenynsii</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0	Agrícola intensivo - 67% cultivo
M35	<i>O. jenynsii,</i> <i>G. rhabdothus</i>	nd	<LQ	nd	nd	<LQ	<LQ	<LQ	4	Agrícola intensivo - 69% cultivo
2021										
C4	Sin análisis									Cobertura natural
M31	Sin análisis									Cobertura natural
OMBÚ		na	nd	10.3	<LQ	na	na	nd	2	Cobertura natural
V7		na	nd	nd	nd	na	na	nd	0	Agrícola bajo - 30%

muestreo, probablemente debido a la variación que introducen las diferencias entre las tallas sitio a sitio, y no guardaron relación con el uso del suelo. Dicha variación, junto a la presencia de tamaños corporales mayores (> 5.7 cm en *B. iheringii* y > 4.5 cm en *C. interruptus*) en las microcuencas consideradas impactadas, no permite afirmar una disminución de tallas en sitios agrícolas debido al crecimiento bajo una exposición crónica a pesticidas. Cabe mencionar que la alta prevalencia de infecciones parasitarias en distintos sitios probablemente no guarde una relación con las tallas de los organismos (Teixeira de Mello & Eguren, 2008).

Las variaciones descritas podrían ser producto de diferencias en la disponibilidad de alimento entre los sitios de muestreo. Aquellos con mayor proporción de vegetación riparia representan una fuente de alimento de mayor variedad por la presencia de semillas, insectos terrestres en la superficie y fondo del cuerpo de agua, algas y detritos; favoreciendo aumentos en la condición corporal por ascensos en el peso (Caetano & Jané, 2018), siendo el caso para ambas especies en los sitios M35, M31 y Ombú.

Predicción 4.

El hígado tendrá un mayor tamaño en individuos provenientes de sitios agrícolas

Para *C. interruptus*, los resultados no cumplen con la predicción ya que se observó una relación entre el desarrollo del hígado y otras actividades fisiológicas no relacionadas con la exposición a pesticidas de los sitios agrícolas. Aquellos sitios con los mayores índices hepatosomáticos promedios fueron los agrícolas medio M35 y C6 y el control Ombú. En el último sitio, el acceso directo del ganado de pastoreo al cuerpo de agua representa una forma de contaminación no considerada previamente que también podría provocar un estrés sobre órganos de depuración como el hígado. En el caso de los sitios M35 y C6 es necesario notar que para aquellos organismos con mayor desarrollo gonadal también revelaron mayor desarrollo hepático. Rinchar & Kestemont (2003) determinó un mayor desarrollo del hígado en el período previo al desove, así como un descenso y mantenimiento del órgano de forma posterior a la reproducción. En vista de ello, el desarrollo hepático podría vincularse más estrechamente con la actividad reproductiva que con procesos de desintoxicación de fitosanitarios y demás contaminantes. En cambio, *B. iheringii* no mostró dicha tendencia ni tuvo diferencias significativas para el valor del índice hepatosomático entre los distintos sitios.

Predicción 5.

Los organismos provenientes de sitios agrícolas tendrán un menor desarrollo gonadal que los extraídos de sitios naturales.

En ninguna de las dos especies existe evidencia estadística de un menor desarrollo gonadal en subcuencas agrícolas. Sin embargo, el análisis permite entrever un comportamiento reproductivo oportunista, no ajustándose a los períodos descritos en la bibliografía.

Las tallas esperadas de *B. iheringii*, obtenidas también para arroyos vadeables de cuenca alta en Argentina durante el período diciembre-abril, son de entre 2.6 y 4.0 cm por lo coinciden a grandes rasgos con las halladas en este trabajo, confirmando el período reproductivo citado en la bibliografía de principios de primavera (agosto-noviembre) (Ferriz et al., 2010). Sin embargo, y contrariamente a lo predicho, los sitios C6, Ombú y V7 demostraron gónadas en desarrollo lejos del período reproductivo conocido. En C6, el único sitio agrícola medio

representado, los organismos podrían presentar actividad reproductiva en un período de tiempo cercano debido a la visualización de alta biomasa gonadal de hasta 0.257 g, con huevos en desarrollo. El tamaño promedio de los organismos en C6 fue el mayor obtenido (>4.0 cm), por lo que existe un sesgo hacia los individuos adultos en relación a los juveniles. En conjunto, ambas variables podrían indicar un retraso temporal en el período reproductivo hacia los meses posteriores al verano. Asimismo, en V7 se hallaron individuos juveniles (<2.5 cm), lo que indicaría una reproducción algo más tardía en dicho sitio.

Para la especie *C. interruptus* se identificaron posibles grupos con distintos períodos reproductivos que en principio no guardan relación con el uso del suelo. En los sitios Ombú, C6 y V7 se hallaron las menores longitudes corporales promedios (<3.0 cm), la mayor heterogeneidad de tallas y gónadas sin estructuras definidas a simple vista (por ejemplo huevos en desarrollo); lo que podría indicar coincidir con la reproducción de primavera citada (Ferriz et al., 2011). Por el contrario, en M35, C4 y M31 los individuos podrían acercarse al segundo período reproductivo descrito, en otoño (Ferriz et al., 2011), evidenciado por la presencia de un gran desarrollo gonadal y la obtención de organismos de mayor tamaño.

Conclusiones

La presencia de pesticidas bioacumulados en peces de relativamente baja posición trófica, pequeño tamaño y con la vía de ingreso de contaminantes casi exclusivamente por exposición directa; indica una alta movilización de fitosanitarios en el ambiente y un destino final en la biota de arroyos que cuentan por una franja riparia de cobertura natural ubicada a pocos kilómetros (entre 5 y 6 km) de superficies forestadas. Asimismo se destaca la relevancia de la aplicación de plaguicidas tanto para usos domésticos como de utilidad veterinaria debido a una acumulación detectable en biota aún cuando los volúmenes del fitosanitario utilizado son, presumiblemente, menores en relación a las cantidades ocupadas por el uso agrícola.

Si bien los sitios de muestreo demostraron ser lo suficientemente distintos entre sí para generar diferencias en la prevalencia de parasitosis, se extrae la conclusión de que *B. iheringii* presenta una mayor sensibilidad a dichas infecciones que *C. interruptus*. De la misma forma, *B. iheringii* demostró un mayor contenido lipídico que *C. interruptus*, siendo la especie en donde se detectó la bioacumulación de plaguicidas lipofílicos. Ambos factores llevan a proponer a *Bryconamericus iheringii* como un mejor bioindicador que *Cheirodon interruptus* para el biomonitoreo de fitosanitarios en el ambiente y para la determinación de estados de salud vulnerables en peces expuestos a esta clase de contaminantes.

En cuanto a las predicciones asociadas a la condición corporal y a los índices gonadosomáticos y hepatosomáticos, se sugiere evaluar la dieta como un factor explicativo de eventuales cambios de mayor relevancia, dado el carácter oportunista tanto en alimentación como en reproducción para ambas especies. No obstante, se han alcanzado resultados novedosos con respecto a la biología de ambas especies. Por ejemplo, en *C. interruptus* se observó una posible correlación entre el desarrollo hepático y el gonadal durante la formación de las huevas, pero no así en *B. iheringii*. Además, el grado de cercanía a la reproducción (presencia de alta biomasa gonadal con estados avanzados de desarrollo) y la comparación con las tallas esperadas permitió captar un comportamiento reproductivo oportunista en ambas especies.

Perspectivas

La profundización de la temática de la tesina debería incluir análisis de dietas (contenidos estomacales, recursos basales disponibles y diversidad de macroinvertebrados) de las especies seleccionadas como bioindicadoras, en pro de determinar la contribución relativa de la alimentación en los eventos reproductivos y la condición corporal; para luego comparar entre sitios con recursos alimenticios similares y distintos uso del suelo y aplicación de fitosanitarios.

En cuanto al análisis de detección de pesticidas, podrían seleccionarse nuevos sitios de muestreo con altas intensidades de uso productivo agrícola e incluir microcuencas forestales. Asimismo, podrían considerarse indicar más de un punto de extracción de individuos por sitio de muestreo con distintas distancias de la superficie agro-forestal.

Bibliografía

Akoto O., Azuure A.A., & Adotey K.D. (2016). Pesticide residues in water, sediment and fish from Tono Reservoir and their health risk implications. *SpringerPlus*, 5, 1849. doi:10.1186/s40064-016-3544-z

Anderson, R. O. & Neumann, R. M. (1996). Length, weight, and associated structural indices. In *Fisheries Techniques*, 2nd edn (Murphy, B. R. & Willis, D. W., eds), pp. 447–482. Bethesda, MD: American Fisheries Society.

Araújo, C. V. M., Silva, D. C. V. R., Gomes, L. E. T., Acayaba, R. D., Montagner, C. C., Moreira-Santos, M., ... Pompêo, M. L. M. (2018). Habitat fragmentation caused by contaminants: Atrazine as a chemical barrier isolating fish populations. *Chemosphere*, 193, 24–31. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.11.014

Arnot, J. A., & Gobas, F. A. P. C. (2004). A FOOD WEB BIOACCUMULATION MODEL FOR ORGANIC CHEMICALS IN AQUATIC ECOSYSTEMS. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(10), 2343. doi:10.1897/03-438

Arocena R., Chalar G., González, I., García P., Piccardo, A., Piccini, C., Vernassa. T., Sandes, P., Castro M. 2018. Evaluación Ecológica de Cursos de Agua y Biomonitorio Cuenca del Rio Negro, Producto 5: Informe Final. Informe técnico presentado a DINAMA, 186pp.

Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M. J., & Cazenave, J. (2014). Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecological Indicators*, 36, 532–538. doi:10.1016/j.ecolind.2013.09.016

Barbosa, A. C., Souza, J. de, Dórea, J. G., Jardim, W. F., & Fadini, P. S. (2003). Mercury Biomagnification in a Tropical Black Water, Rio Negro, Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45(2), 235–246. doi:10.1007/s00244-003-0207-1

Belenguer, V., Martinez-Capel, F., Masiá, A., & Picó, Y. (2014). Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain). *Journal of Hazardous Materials*, 265, 271–279. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.11.016

Beltran-Pedrerros, S., Zuanon, J., Leite, R. G., Peleja, J. R. P., Mendonça, A. B., & Forsberg, B. R. (2011). Mercury bioaccumulation in fish of commercial importance from different trophic categories in an Amazon floodplain lake. *Neotropical Ichthyology*, 9(4), 901–908. doi:10.1590/s1679-62252011000400022

Bistoni, M. A.; Hued, A. C.; Videla, M. M. & Sagretti, L. (1999). Efectos de la calidad del agua sobre las comunidades ícticas de la región central de Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural* 72:325-335

Boxall, A. B. A., Fogg, L. A., Blackwell, P. A., Blackwell, P., Kay, P., Pemberton, E. J., & Croxford, A. (2004). Veterinary Medicines in the Environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1–91. doi:10.1007/0-387-21729-0_1

Brodeur, J. C., Malpel, S., Anglesio, A. B., Cristos, D., D'Andrea, M. F., & Poliserpi, M. B. (2016). Toxicities of glyphosate- and cypermethrin-based pesticides are antagonistic in the tenspotted livebearer fish (*Cnesterodon decemmaculatus*). *Chemosphere*, 155, 429–435. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.04.075

Brodeur, J. C., Sanchez, M., Castro, L., Rojas, D. E., Cristos, D., Damonte, M. J., ... Andriulo, A. E. (2017). Accumulation of current-use pesticides, cholinesterase inhibition and reduced body condition in juvenile one-sided livebearer fish (*Jenynsia multidentata*) from the agricultural Pampa region of Argentina. *Chemosphere*, 185, 36–46. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.06.129

Burreau, S., Zebühr, Y., Broman, D., & Ishaq, R. (2006). Biomagnification of PBDEs and PCBs in food webs from the Baltic Sea and the northern Atlantic Ocean. *Science of The Total Environment*, 366(2-3), 659–672. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.02.005

Caetano, D. L., & Jané, D. (2018). Peso-comprimento e fator de condição relativo de *Bryconamericus iheringii* em riachos do Paranapanema. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 11(3), 826–841.

Ccancapa, A., Masiá, A., Andreu, V., & Picó, Y. (2016). Spatio-temporal patterns of pesticide residues in the Turia and Júcar Rivers (Spain). *Science of The Total Environment*, 540, 200–210. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.063

Chalar, G., Delbene, L., González-Bergonzoni, I., & Arocena, R. (2013). Fish assemblage changes along a trophic gradient induced by agricultural activities (Santa Lucía, Uruguay). *Ecological Indicators*, 24, 582–588. doi:10.1016/j.ecolind.2012.08.010

Chapman, D.V. (Ed.), 1996. *Water Quality Assessments: a Guide to the Use of Biota, Sediments, and Water in Environmental Monitoring*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41850>.

Clasen, B., Loro, V. L., Murussi, C. R., Tiecher, T. L., Moraes, B., & Zanella, R. (2018). Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. *Science of The Total Environment*, 626, 737–743. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.154

Cleary, J. A., Tillitt, D. E., vom Saal, F. S., Nicks, D. K., Claunch, R. A., & Bhandari, R. K. (2019). Atrazine induced transgenerational reproductive effects in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Pollution*, 251, 639–650. doi:10.1016/j.envpol.2019.05.013

Comité Científico CARU. 2019. Plan de Monitoreo Integral del Río Uruguay para todo el tramo compartido. Subprograma 1. Monitoreo de la calidad de agua, sedimento y biota en el Río Uruguay. Informe primeros seis meses de monitoreo. 240 páginas. Comisión Administradora del Río Uruguay.

Comité Científico CARU. 2016. Programa de conservación de la fauna íctica y los recursos pesqueros del río Uruguay. Análisis de residuos de contaminantes en tejidos de peces del Río Uruguay. Informe período 2015-2016. 29 páginas. Comisión Administradora del Río Uruguay.

Colazzo, M., Alonso, B., Ernst, F., Cesio, M. V., Perez-Parada, A., Heinzen, H., & Pareja, L. (2019). Determination of multiclass, semi-polar pesticide residues in fatty fish muscle tissue by gas and liquid chromatography mass spectrometry. *MethodsX*. doi:10.1016/j.mex.2019.04.014

Das Neves, J., Barnhoorn, I.E.J. & Wagenaar, G.M. (2018). The effects of environmentally relevant concentrations of aldrin and methoxychlor on the testes and sperm of male *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) after short-term exposure. *Fish Physiol Biochem* 44, 1421–1434). <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0474-4>

Daverat, F., Tapie, N., Quiniou, L., Maury Brachet, R., Riso, R., Eon, M., ... Budzinski, H. (2011). Otolith microchemistry interrogation of comparative contamination by Cd, Cu and PCBs of eel and flounder, in a large SW France catchment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(3), 332–338. doi:10.1016/j.ecss.2011.01.011

De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., & Costa, J. L. (2014). Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*, 107, 423–431. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.039

Delbene, L. (2010). Calidad de agua en la cuenca del Río Santa Lucía (Uruguay) utilizando peces como indicadores: relación con el uso del suelo. In: Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo.

Deribe, E., Rosseland, B. O., Borgstrøm, R., Salbu, B., Gebremariam, Z., Dadebo, E., ... Eklo, O. M. (2011). Bioaccumulation of persistent organic pollutants (POPs) in fish species from Lake Koka, Ethiopia: The influence of lipid content and trophic position. *Science of The Total Environment*, 410-411, 136–145. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.09.008

Dietz, R., Letcher, R. J., Desforges, J.-P., Eulaers, I., Sonne, C., Wilson, S., ... Bustnes, J. O. (2019). Current state of knowledge on biological effects from contaminants on arctic wildlife and fish. *Science of The Total Environment* 696, 133792. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.133792

Elskus, A.A., 2012, Toxicity, sublethal effects, and potential modes of action of select fungicides on freshwater fish and invertebrates: U.S. Geological Survey Open-File Report 2012–1213, 42 p., at <http://pubs.usgs.gov/of/2012/1213/>.

Ernst, F., Alonso, B., Colazzo, M., Pareja, L., Cesio, V., Pereira, A., ... Pérez-Parada, A. (2018). Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems. *Science of The Total Environment*, 631-632, 169–179. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.02.320

Espectrofotometría de masas. Repositorio de investigación. Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN, España) - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España).

European Commission, Document N SANTE/11945/2016, Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (2015).

European Commission, EU Pesticides Database. *Search Active substances, safeners and synergists*.

(s/f).<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/>

Fernandez-Alba, A.R., Guil, L.H., Lopez, G.M., Chisti, Y. (2001). Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Anal. Chim. Acta* 426, 289–301.

Fernández-Alba, A. R., Hernando, M. D., Piedra, L., & Chisti, Y. (2002). Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta*, 456(2), 303–312. doi:10.1016/s0003-2670(02)00037-5.

Ferriz, R. A., Bentos, C. A., López, G. R., Fernández, E. M. (2010). Algunos aspectos biológicos de *Bryconamericus iheringii* (Ostariophysi: Characidae) en dos arroyos de la alta cuenca del río Samborombón, Argentina. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 12 (2), 109-116.

Ferriz, R. A., Bentos, C. A., Fernández, E. M., López, G. R. (2011). Reproducción y dinámica poblacional de *Cheirodon interruptus* (Ostariophysi: Characidae) en el arroyo El Portugués, alta cuenca del río Samborombón, Argentina. *Latin american journal of aquatic research*, 39 (1), 151-160.

Gandar, A., Laffaille, P., Marty-Gasset, N., Viala, D., Molette, C., & Jean, S. (2017). Proteome response of fish under multiple stress exposure: Effects of pesticide mixtures and temperature increase. *Aquatic Toxicology*, 184, 61–77. doi:10.1016/j.aquatox.2017.01.004.

Gewurtz, S. B., Bhavsar, S. P., & Fletcher, R. (2011). Influence of fish size and sex on mercury/PCB concentration: Importance for fish consumption advisories. *Environment International*, 37(2), 425–434. doi:10.1016/j.envint.2010.11.005.

González-Bergonzoni, I., Jeppesen, E., Vidal, N., Teixeira-de Mello, F., Goyenola, G., López-Rodríguez, A., & Meerhoff, M. (2015). Potential drivers of seasonal shifts in fish omnivory in a subtropical stream. *Hydrobiologia*, 768(1), 183–196. doi:10.1007/s10750-015-2546-0.

González-Bergonzoni, I., Chalar, G., Pérez-Parada, A., & Arocena, R. (2019). Informe sobre la presencia de pesticidas en músculo de peces de arroyos de la cuenca del Río Negro. Convenio MVOTMA (DINAMA) - Universidad de La República (Facultad de Ciencias).

Gutiérrez, M. C. & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Instituto de Investigación Textil y Cooperación Industrial. *Boletín INTEXTER*, 122, 25-41.

Halmelink, J. & Spacie, A. (1997). Fish and chemicals: The process of accumulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 17(1), 167-177.

Hoekstra, P. F., O'Hara, T. M., Fisk, A. T., Borgå, K., Solomon, K. R., & Muir, D. C. G. (2003). Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort–Chukchi Seas. *Environmental Pollution*, 124(3), 509–522. doi:10.1016/s0269-7491(02)00482-7.

Ivancovich, A. (2018). Enfermedades de soja: Diagnóstico y Manejo. INTA Pergamino, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca - Presidencia de la Nación. Ed.: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. Extraído de www.agro.unc.edu.ar/~wpweb/fitopatologia/wp-content/uploads/sites/30/2018/03/Enfermedades-de-soja.-Diagnostico-y-manejo..pdf.

Jia, M., Wang, Y., Wang, D., Teng, M., Yan, J., Yan, S., ... Zhu, W. (2019). The effects of hexaconazole and epoxiconazole enantiomers on metabolic profile following exposure to zebrafish (*Danio rerio*) as well as the histopathological changes. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.140

Karr, J. R. (1981). Assessment of Biotic Integrity Using Fish Communities. *Fisheries*, 6(6), 21–27. doi:10.1577/1548-8446(1981)006<0021:aobiuf>2.0.co;2.

Kelly, D. W., Poulin, R., Tompkins, D. M., & Townsend, C. R. (2010a). Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *Journal of Applied Ecology*, 47(2), 498–504. doi:10.1111/j.1365-2664.2010.01791.x .

Kelly, D. W., Thomas, H., Thieltges, D. W., Poulin, R., & Tompkins, D. M. (2010b). Trematode infection causes malformations and population effects in a declining New Zealand fish. *Journal of Animal Ecology*, 79(2), 445–452. doi:10.1111/j.1365-2656.2009.01636.x.

Khan, S. J., Roser, D. J., Davies, C. M., Peters, G. M., Stuetz, R. M., Tucker, R., & Ashbolt, N. J. (2008). Chemical contaminants in feedlot wastes: Concentrations, effects and attenuation. *Environment International*, 34(6), 839–859. doi:10.1016/j.envint.2007.10.007

Köhler, H. & Triebkorn, R. (2013). Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science Magazine*, 341, 759 -765.

Kokubun, É. E., Bonato, K. O., Burress, E. D., & Fialho, C. B. (2018). Diet and body shape among populations of *Bryconamericus iheringii* (Otophysi: Characidae) across the Campos Sulinos ecosystem. *Neotropical Ichthyology*, 16(4). doi:10.1590/1982-0224-20170167.

LeBlanc, G. A. (1995). Trophic-Level Differences in the Bioconcentration of Chemicals: Implications in Assessing Environmental Biomagnification. *Environmental Science & Technology*, 29(1), 154–160. doi:10.1021/es00001a020.

López, A., Sidorkewicz, N. (2005). Edad y crecimiento de *Cheirodon interruptus* (Characiformes: Tetragonopteridae) en la cuenca alta del río Sauce Grande, provincia de Buenos Aires. *Revista Biología Acuática* (22), 189-196.

Machado, I., Gérez, N., Pistón, M., Heinzen, H., & Cesio, M. V. (2017). Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC–MS and LC–MS/MS using the

same QuEChERS procedure. *Food Chemistry*, 227, 227–236. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.025.

Masiá, A., Campo, J., Navarro-Ortega, A., Barceló, D., & Picó, Y. (2015). Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Science of The Total Environment*, 503-504, 58–68. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.095.

Menni, R.C. & A.E. Almirón. 1994. Reproductive seasonality in fishes manmade ponds in temperate South America. *Neotrópica*, 40(103-104): 75-85.

Ministerio de Ganadería, A. y P. (MGAP). (s/f). *Consulta de Productos Fitosanitarios*. <https://www.mgap.gub.uy/profit/pantalla.aspx>

Miranda, A. L., Roche, H., Randi, M. A. F., Menezes, M. L., & Ribeiro, C. A. O. (2008). Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. *Environment International*, 34(7), 939–949. doi:10.1016/j.envint.2008.02.004

Moreno, J. M., Aguilar, F. A., Boada, N. S., Rojas, J. A., & Prieto, C. A. (2019). Análisis morfométrico e índices corporales del capitán de la sabana (*Eremophilus mutisii*). *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 66(2), 141–153. doi:10.15446/rfmvz.v66n2.82433

Niell, S., Jesús, F., Pérez, C., Mendoza, Y., Díaz, R., Franco, J., ... Heinzen, H. (2015). QuEChERS Adaptability for the Analysis of Pesticide Residues in Beehive Products Seeking the Development of an Agroecosystem Sustainability Monitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18), 4484–4492. doi:10.1021/acs.jafc.5b00795

Olsvik, P. A., Kroglund, F., Finstad, B., & Kristensen, T. (2010). Effects of the fungicide azoxystrobin on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(8), 1852–1861. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.017

Page, D., Miotliński, K., Gonzalez, D., Barry, K., Dillon, P., & Gallen, C. (2014). Environmental monitoring of selected pesticides and organic chemicals in urban stormwater recycling systems using passive sampling techniques. *Journal of Contaminant Hydrology*, 158, 65–77. doi:10.1016/j.jconhyd.2014.01.004

Pareja, L., Cesio, V., Heinzen, H., & Fernández-Alba, A. R. (2011). Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC–MS/MS. *Talanta*, 83(5), 1613–1622. doi:10.1016/j.talanta.2010.11.052

Pascual Aguilar, J. A., Andreu, V., Campo, J., Picó, Y., & Masiá, A. (2017). Pesticide occurrence in the waters of Júcar River, Spain from different farming landscapes. *Science of The Total Environment*, 607-608, 752–760. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.176

- Pérez-Parada, A., Goyenola, G., Teixeira de Mello, F., & Heinzen, H. (2018). Recent advances and open questions around pesticide dynamics and effects on freshwater fishes. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 4, 38-44. doi:10.1016/j.coesh.2018.08.004
- Peterson, E. M., Green, F. B., & Smith, P. N. (2020). Pesticides Used on Beef Cattle Feed Yards Are Aerially Transported into the Environment Via Particulate Matter. *Environmental Science & Technology*, 54(20), 13008–13015. doi:10.1021/acs.est.0c03603
- Poulin, R. (1992). Toxic pollution and parasitism in freshwater fish. *Parasitology Today*, 8(2), 58–61. doi:10.1016/0169-4758(92)90090-o
- Renick, V. C., Weinersmith, K., Vidal-Dorsch, D. E., & Anderson, T. W. (2016). Effects of a pesticide and a parasite on neurological, endocrine, and behavioral responses of an estuarine fish. *Aquatic Toxicology*, 170, 335–343. doi:10.1016/j.aquatox.2015.09.010
- Rinchard, J., & Kestemont, P. (2003). Liver Changes Related to Oocyte Growth in Roach, a Single Spawner Fish, and in Bleak and White Bream, Two Multiple Spawner Fish. *International Review of Hydrobiology*, 88(1), 68–76. doi:10.1002/iroh.200390006
- Rocha, A. A., Monteiro, S. H., Andrade, G. C. R. M., Vilca, F. Z., & Tornisielo, V. L. (2015). Monitoring of Pesticide Residues in Surface and Subsurface Waters, Sediments, and Fish in Center-Pivot Irrigation Areas. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26 (11), 2269-2278. doi:10.5935/0103-5053.20150215
- Rossi, A. S., Fantón, N., Michlig, M. P., Repetti, M. R., & Cazenave, J. (2020). Fish inhabiting rice fields: Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxic effects after pesticides application. *Ecological Indicators*, 113, 106186. doi:10.1016/j.ecolind.2020.106186
- Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., & Schlenk, D. (2004). Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere*, 55(6), 797–809. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.12.009
- Sato, T. (2006). Occurrence of Deformed Fish and Their Fitness-related Traits in Kirikuchi Charr, *Salvelinus leucomaenis japonicus*, the Southernmost Population of the Genus *Salvelinus*. *Zoological Science*, 23(7), 593–599. doi:10.2108/zsj.23.593
- Schreinemachers, P., & Tipraqsa, P. (2012). Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy*, 37(6), 616–626. doi:10.1016/j.foodpol.2012.06.003
- Scholes, R. C., Hageman, K. J., Closs, G. P., Stirling, C. H., Reid, M. R., Gabrielsson, R., & Augspurger, J. M. (2016). Predictors of pesticide concentrations in freshwater trout – The role of life history. *Environmental Pollution*, 219, 253–261. doi:10.1016/j.envpol.2016.10.017
- Scott, P. D., Coleman, H. M., Khan, S., Lim, R., McDonald, J. A., Mondon, J., ... Leusch, F. D. L. (2018). Histopathology, vitellogenin and chemical body burden in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) sampled from six river sites receiving a gradient of stressors. *Science of The Total Environment*, 616-617, 1638–1648. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.148

Stábile, F. (2018) Estructura de la red trófica y presencia de plaguicidas en el sistema Laguna del Sauce: bases para el desarrollo de estrategias de biomonitoreo. In: Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo.

Steedman, R. J. (1991). Occurrence and Environmental Correlates of Black Spot Disease in Stream Fishes near Toronto, Ontario. *Transactions of the American Fisheries Society*, 120(4), 494–499. doi:10.1577/1548-8659(1991)120<0494:oaecob>2.3.co;2

Tadokoro, H., & Tomita, Y. (1987). The Relationship between Bioaccumulation and Lipid Content of Fish. *QSAR in Environmental Toxicology - II*, 363–373. doi:10.1007/978-94-009-3937-0_27

Teixeira de Mello F. (2007a). 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). In: Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo.

Teixeira de Mello, Franco & Eguren, Gabriela. (2008). Prevalence and intensity of black-spot disease in fish community from a subtropical stream (Santa Lucía river basin, Uruguay). *Limnetica*. 27. 251-258.

Teixeira de Mello, F., Gonzalez-Bergonzoni, I., Viana, F., & Saizar, C. (2011). Length-weight relationships of 26 fish species from the middle section of the Negro River (Tacuarembó-Durazno, Uruguay). *Journal of Applied Ichthyology*, 27(6), 1413–1415. doi:10.1111/j.1439-0426.2011.01810.x

Teixeira de Mello, F.; González-Bergonzoni, I. & Loureiro, M. (2011). Peces de agua dulce del Uruguay. PPR-MGAP. 188 pp

Teixeira de Mello F., Rodríguez-Bolaña C., Tesitore G., Kröger A., Goyenola G, Pérez-Parada A, Heinzen H. (2020). Aportes a la construcción de capacidades nacionales para el monitoreo ambiental de plaguicidas utilizando la cuenca de la Laguna del Cisne como caso de estudio. Enmarcado en el Proyecto: Fortalecimiento de las capacidades para la gestión ambientalmente adecuada de plaguicidas incluyendo COPS, GCP/URU/031/GFF -MSP-MGAP-MVOTMA-FAO-GEF- 2016-2020. Montevideo, Uruguay. 150pp.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2002 – Registration eligibility science chapter for atrazine environmental fate and effects chapter. Washington, DC, USA.

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149. doi:10.1016/s1382-6689(02)00126-6

Vazzoler, A.E.A. de M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. EDUEM, Maringá, Sao Pablo 169 p.

Wang, H., Meng, Z., Zhou, L., Cao, Z., Liao, X., Ye, R., & Lu, H. (2019a). Effects of acetochlor on neurogenesis and behaviour in zebrafish at early developmental stages. *Chemosphere*, 220, 954–964. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.199

Wang, F., Yang, Qw., & Zhao, WJ. (2019b) Effects of short-time exposure to atrazine on miRNA expression profiles in the gonad of common carp (*Cyprinus carpio*). *BMC Genomics* 20, 587. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5896-6>

Yu, Y.-X., Zhang, S.H., Huang, N.-B., Li, J.-L., Pang, Y.-P., Zhang, X.-Y., ... Xu, Z.-G. (2012). Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in freshwater fish from Taihu Lake, China: Their levels and the factors that influence biomagnification. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(3), 542–549. doi:10.1002/etc.1722

Zaldúa N., Ríos M., Teixeira-de Mello F., Gonzalez-Bergonzoni I., Miguele C., Rosano A. & Spinelli, W. (2010). Evaluación participativa de niveles de plaguicidas en peces de interés comercial del Sitio RAMSAR. En: Evaluación participativa de plaguicidas en el sitio RAMSAR, Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. Ríos M., Zaldúa N., & Cupeiro S. (eds). *Vida Silvestre*. 59-76 p.

Zhang, H., & Kelly, B. C. (2018). Sorption and bioaccumulation behavior of multi-class hydrophobic organic contaminants in a tropical marine food web. *Chemosphere*, 199, 44–53. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.01.173

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., & Jiang, G. (2008). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, 606(2), 135–150. doi:10.1016/j.aca.2007.11.018

Anexos

1. Fotos de los sitios de muestreo

- Agrícola medio, M35:



Anexo 1A. Fotos tomadas in situ. Márgenes riparios con abundante vegetación, sedimento barroso/limoso y presencia de aceites o coadyudantes de fitosanitarios en la superficie del agua. Entorno inmediato luego de la vegetación de soja florecida aún verde.

- Agrícola medio, C6:



Anexo 1B. Foto tomada in situ. Márgenes riparios con escasa vegetación, sedimento gravoso.

- **Agrícola bajo, V7:**



Anexo 1C. Foto tomada in situ. Márgenes riparios con escasa vegetación, sedimento arenoso.

- **Sitio control, M31:**



Anexo 1D. Foto tomada in situ. Márgenes riparios con abundante vegetación, sedimento barroso/limoso.

- **Sitio control, C4:**



Anexo 1E. Foto tomada in situ. Márgenes con escasa vegetación, superficie de fondo rocosa.

- **Sitio control, Ombú:**



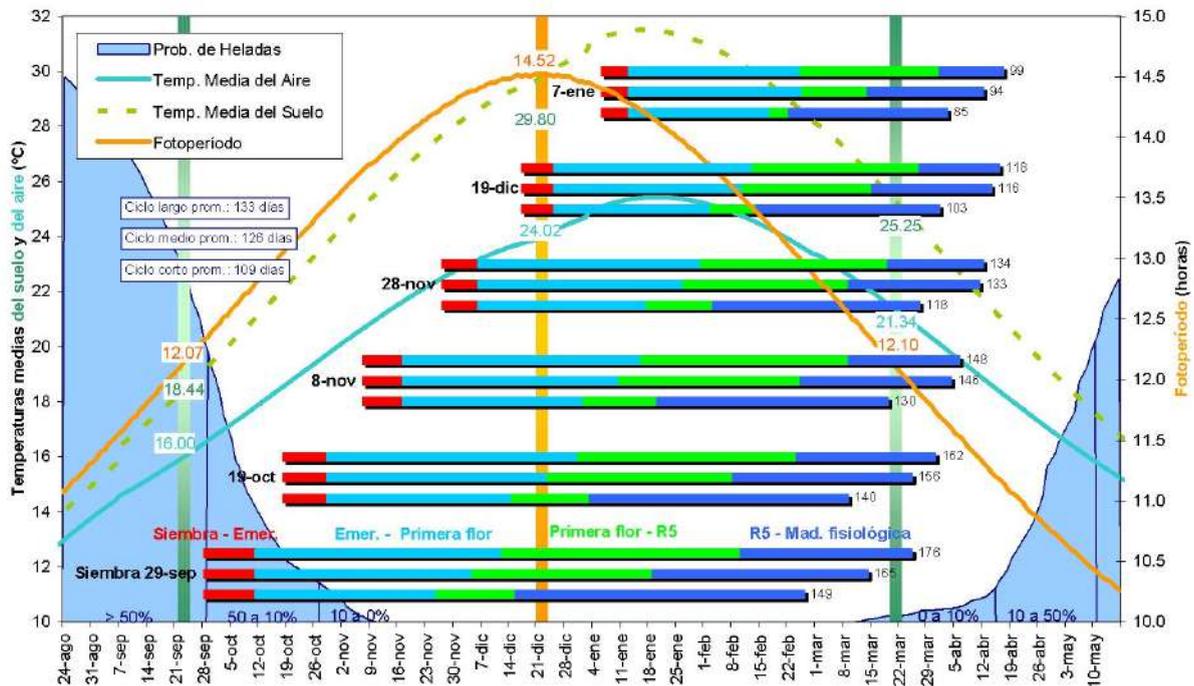
Anexo 1F. Foto obtenida de GoogleEarth. Márgenes con escasa vegetación, superficie de fondo rocosa. Durante el muestreo el nivel de agua era mayor, cubriendo el lecho hasta el comienzo de la grava.

2. Calendario agrícola de cultivos en Uruguay



Anexo 2. Calendario de siembra y cosecha. Obtenido desde <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/7115/1/Siembras.pdf>
 MGAP-DIEA. Calistro, E. (2015). Meses en los cuales se realizan operativas de siembra y cosecha de Cultivos y Forrajeras en Uruguay, precipitaciones y temperaturas históricas mensual y estacional.

3. Estados de maduración de cultivos de verano (soja)



Anexo 3. Predicción de estados fenológicos del cultivo de soja para el norte de Uruguay. Se identifican los distintos períodos del ciclo de la soja: i) rojo: entre la siembra y la emergencia de la plántula, ii) celeste: entre la emergencia de la plántula y la primera flor, iii) en verde: entre la primera flor hasta el llenado de las vainas y iv) en azul: desde el llenado de las vainas hasta la cosecha. Las aplicaciones de plaguicidas se intensifican a partir de R1 y hasta la cosecha.

Obtenido desde <http://www.inia.uy/gras/Alertas-y-herramientas/Utilidades>.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA. (s/f). Predicción de estados fenológicos de soja y otros cultivos de verano.

4. Protocolo de extracción de residuos de pesticidas y especificaciones de los métodos analíticos (Colazzo et al., 2019)

- Extracción y purificación, versión sin buffer

- 1) Pesar 10 g de muestra homogeneizada en un tubo falcon de 50 ml.
- 2) Añadir 10 ml de MeCN y agitar a mano vigorosamente durante 1 minuto.
- 3) Añadir 10 µl de TPP de 10µg.mL⁻¹ y dejar asentar por 1 minuto.
- 4) Añadir 1.5 g de NaCl y 4 g de MgSO₄. Agitar a mano vigorosamente durante 4 minutos. Centrifugar a 2260 rpm.g⁻¹ durante 5 minutos.
- 5) Transferir 7 ml de alícuota del sobrenadante de centrifugación a un tubo falcon de 15 ml que contenga 350 mg de PSA, 180 mg de C-18 y 1g de MgSO₄. Vortexear la mezcla por 30 segundos y volver a centrifugar a 2260 rpm.g⁻¹ durante 5 minutos.
- 6) Filtrar 1 ml de sobrenadante a través de un filtro PTFE de 0.22 µm y coleccionar en un vial de vidrio de 2 ml para análisis de LC-MS/MS.
- 7) Evaporar 4ml de la solución purificada con un flujo constante de nitrógeno gaseoso. Redisolver en 1 ml de bromofos metilo de 0.5 mg.ml⁻¹ para GC-MS.

- Cromatografía de gas y espectrometría de masas, GC-MS

Se utilizó la columna capilar con sílice Shimadzu GC-QP2010 Ultra (Kyoto, Japan) equipada con un Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) TRACETM TR-5MS (5% de fenil polisilfenilen-siloxano (30 m, 0.25 mm i.d. y 0.25 mm de espesor). Los espectros de masas de ionización por impacto de electrones (EI) se obtuvieron a 70 eV y se evaluaron desde 50 a 550 m/z para un análisis de barrido completo. El sistema MS se programó en el modo de monitorización de iones seleccionados (SIM). Los parámetros de trabajo fueron: temperatura del inyector 280 °C; temperatura de la interfaz 280 °C; portador de He a 1 ml.min⁻¹. Las condiciones del horno fueron de 120 °C iniciales (retención de 5 min), aumentado a 190 °C a una velocidad de 10 °C.min⁻¹ (retención de 1 min), luego a 250 °C con velocidad de 5 °C.min⁻¹ (retención de 5 min) y finalmente a 300 °C a 5 °C.min⁻¹ (retención de 5 min). Modo de inyección: splitless; volumen de inyección: 1,0 ml. La identificación de los compuestos se confirmó mediante la inyección de patrones estandarizados de matriz y disolvente y la comparación de su índice de retención y las proporciones de MS relevantes. Para el control de instrumentos y el procesamiento de datos se utilizó GC – MS Solution versión 4.11 SU2 con bibliotecas de MS.

- Cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem, LC-MS/MS

Los análisis LC–MS/MS se realizaron con un sistema LC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU.) acoplado a una trampa de iones tetrapolar-lineal Sciex 4000QTRAP (Concord, Canadá) y operada en modo MS MS de triple tetrapolar. La separación por LC se realizó en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm 4.6 mm, 5 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). La operación del gradiente de LC involucró dos componentes eluyentes: (A) agua o ácido fórmico al 0.1% y (B) MeCN. Se ejecutó a 600 ml.min⁻¹ comenzando con 90% de componente A en el momento de la inyección y estable durante 3 min, cambiando gradualmente a 0% A (100% B) durante 20 min y estable durante 5

min, luego a 90% A (10% B) durante 3 min. Esta composición eluyente se mantuvo durante 5 min, calculando un tiempo total de ejecución de 33 min. El volumen de inyección fue de 5 ml. La detección de MS/MS se realizó rutinariamente con el software Analyst v 1.5.1 (SCIEX) para la adquisición y procesamiento de datos.

5. Lista de productos fitosanitarios analizados

	Principio activo	Producto de degradación	Grupo químico
<i>Herbicida</i>			
Alacloro	x		
Atrazina	x		Triazina
Atrazina desetil		x	Triazina
Atrazina desisopropil		x	Triazina
Diuron	x		Urea
Fluroxipir	x		Ác. piridin-carboxílicos
Simazina	x		Triazina
Trifluralina	x		Dinitroanilinas
<i>Fungicidas</i>			
Azoxistrobina	x		Estrobilurina
Trifloxistrobina	x		Estrobina

5. Lista de productos fitosanitarios analizados (continuación)

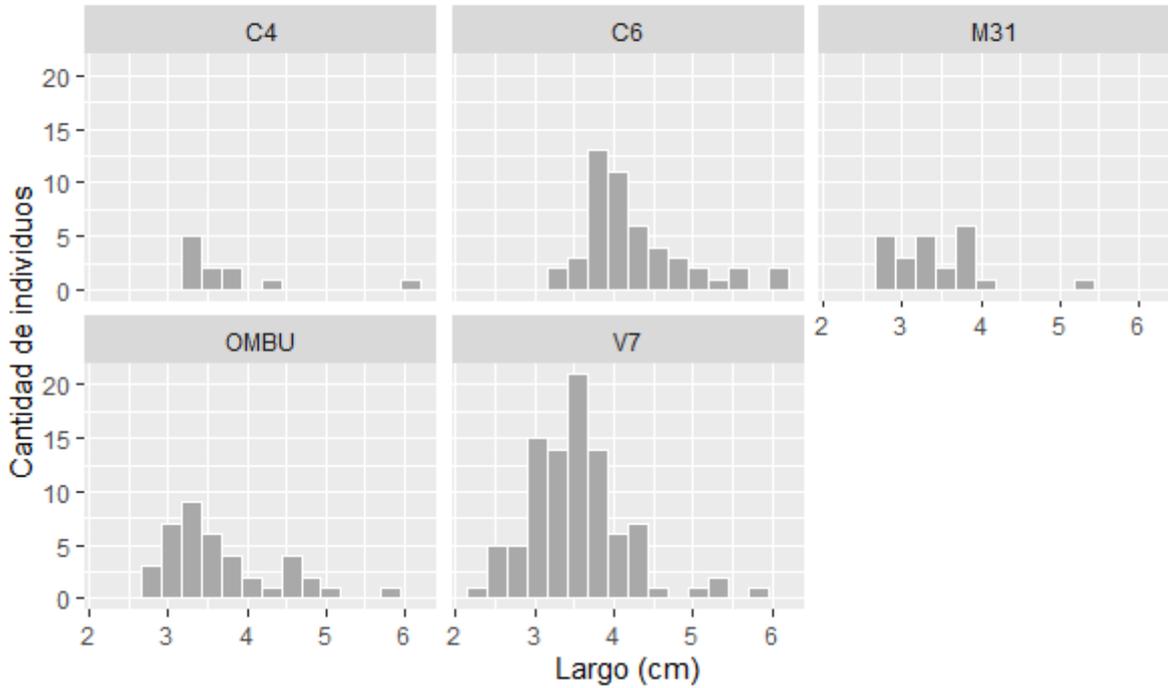
	Principio activo	Producto de degradación	Grupo químico
<i>Insecticidas</i>			
Aldrín	x		Organoclorado
Bifentrina	x		Piretroide
Cifluralina	x		Piretroide
Cipermetrina	x		Piretroide
Clordano cis	x		Organoclorado
Clordano trans	x		Organoclorado
Clorpirifos metil	x		Organofosforado
DDT	x		Organoclorado
Deltametrina	x		Piretroide
Diazinon	x		Organofosforado
Dieldrín	x		Organoclorado
Endosulfán alfa	x		Organoclorado
Endosulfán beta	x		Organoclorado
Endosulfán sulfato		x	Organoclorado
Endrín - rodenticida	x		Organoclorado
Etión	x		Organofosforado
Heptacloro	x		Organoclorado
Hexaclorobenceno	x		Organoclorado
Lamba-cialotrina	x		Piretroide
Lindano	x		Organoclorado
Malatión	x		Organofosforado
Metil paratión	x		Organofosforado

Metoxiclor	x		Organoclorado
Mirex	x		Organoclorado
o,p' DDD		x	Organoclorado
o,p' DDE		x	Organoclorado
o,p' DDT		x	Organoclorado
p,p' DDD		x	Organoclorado
p,p' DDE		x	Organoclorado
p,p' DDT		x	Organoclorado
Permetrina	x		Piretroide

6. Distribución de las tallas en cada sitio de muestreo para la totalidad de individuos de *B. iheringii* y *C. interruptus*

Frecuencia de tamaños corporales

B. iheringii



Frecuencia de tamaños corporales

C. interruptus

