

Tesis Doctoral

Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce

Vera, María Solange

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vera, María Solange. (2011). Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Vera, María Solange. "Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA, GENÉTICA Y EVOLUCIÓN

Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce.

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Ciencias Biológicas

LIC. MARÍA SOLANGE VERA

Directora de Tesis: Dra. Haydée Pizarro

Consejera de Estudios: Dra. Irina Izaguirre

Lugar de trabajo: Laboratorio de Limnología.

Buenos Aires, 2011

ÍNDICE

Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	v
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
<i>Contaminantes ambientales</i>	1
Plaguicidas	1
Herbicidas	2
<i>Glifosato</i>	2
Descubrimiento del glifosato	3
Mecanismo de acción del glifosato	3
Formulados de glifosato	5
El glifosato en el mundo	6
El glifosato en la Argentina	7
Interacciones del herbicida en el suelo	10
Interacciones en el agua	13
<i>Modelos para estudiar los efectos de xenobióticos en el ambiente acuático</i>	15
El perifiton	18
<i>Impacto del glifosato en organismos acuáticos no blanco</i>	21
OBJETIVO GENERAL	25
CAPÍTULO 1	
Efectos del Roundup® sobre comunidades microbianas de agua dulce: estudio en mesocosmos	26
<i>Introducción</i>	26
Hipótesis	28
<i>Materiales y métodos</i>	29
Construcción y preparación de las unidades experimentales	29
Diseño experimental	30
Variables biológicas	30
Comunidad perifítica	30
Análisis cuantitativo del plancton	33
Producción primaria fitoplanctónica	33
Variables físico-químicas	34

ÍNDICE

Análisis físicos y químicos del agua de los mesocosmos	34
Análisis de la concentración de glifosato	35
Análisis estadístico	35
<i>Resultados</i>	36
Efecto del Roundup® sobre la comunidad perifítica	36
Efectos sobre el plancton	43
Características físicas y químicas del agua de los mesocosmos	46
Disipación del glifosato	48
<i>Discusión</i>	49
CAPÍTULO 2	
Efecto a largo plazo del Roundup® en mesocosmos	53
<i>Discusión</i>	57
CAPÍTULO 3	
Impacto del Roundup® en la colonización y sucesión de la comunidad perifítica de agua dulce: estudio en mesocosmos	60
<i>Introducción</i>	60
Hipótesis	61
<i>Materiales y métodos</i>	63
Diseño experimental	63
Variables físicas y químicas del agua de los mesocosmos	63
Análisis del perifiton	64
Análisis estadístico	68
<i>Resultados</i>	69
Efectos del Roundup® sobre la comunidad perifítica	69
Características del agua de los mesocosmos	78
Evolución del glifosato	81
<i>Discusión</i>	83
CAPÍTULO 4	
Impacto del herbicida Glifosato Atanor® sobre comunidades microbianas de agua dulce: experimento en microcosmos	86
<i>Introducción</i>	86
Hipótesis	87
<i>Materiales y métodos</i>	89
Preparación del cuerpo de agua artificial	89

ÍNDICE

Diseño experimental	89
Variables biológicas	91
Perifiton	91
Fitoplancton y bacterioplancton	93
Zooplancton	94
Variables físico-químicas del agua	95
Análisis estadístico	96
<i>Resultados</i>	97
Efectos sobre la comunidad perifítica	97
Efectos sobre el fitoplancton y el bacterioplancton	114
Efectos sobre el zooplancton	120
Características del agua de los microcosmos	122
Disipación del glifosato	130
<i>Discusión</i>	131

CAPÍTULO 5

Efecto comparativo del glifosato grado técnico y el formulado comercial

Glifosato Atanor® sobre la comunidad perifítica de agua dulce 139

Introducción 139

Hipótesis 141

Materiales y métodos 143

Análisis estadístico 147

Resultados 148

Discusión 153

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES 158

Perspectivas 160

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 164

ANEXO

Publicaciones científicas 203

Manuscrito: **Pérez G. L., Torremorell A., Mugni H., Rodríguez P., Vera M. S., do Nascimento M., Allende L., Bustingorry J., Escaray R., Ferraro M., Izaguirre I., Pizarro H., Bonetto C., Morris D. P., Zagarese H. 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications* 17: 2310-2322.**

Manuscrito: **Vera M. S., Lagomarsino L., Sylvester M., Pérez G., Rodríguez P., Mugni H., Sinistro R., Ferraro M., Bonetto C., Zagarese H., Pizarro H. 2010. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19: 710–721.**

IMPACTO DEL GLIFOSATO Y ALGUNOS DE SUS FORMULADOS COMERCIALES SOBRE EL PERIFITON DE AGUA DULCE

El objetivo de esta tesis es analizar el efecto del glifosato y el de algunos de sus formulados comerciales en el perifiton de agua dulce desde un punto de vista integrado y ecológico a escalas comunidad y ecosistema, a través de experimentos en mesocosmos y microcosmos en condiciones controladas de laboratorio y al aire libre. A escala comunidad se estudió la comunidad perifítica en laboratorio, analizando los posibles cambios en su estructura por adición de glifosato grado técnico y un formulado. A escala ecosistema se estudió el efecto de algunos formulados de glifosato sobre el perifiton en interacción con otras comunidades acuáticas microbianas (fitoplancton, bacterioplancton y zooplancton) analizando tanto su estructura y funcionalidad como sus interacciones y con el medio abiótico circundante. Nuestros resultados demuestran que el glifosato altera significativamente la estructura y funcionamiento del perifiton, de las otras comunidades microbianas y la calidad del agua en general favoreciendo la eutroficación. El efecto es directo sobre las comunidades autótrofas y se extiende a través de las tramas tróficas. El glifosato no es inocuo para el ambiente y por lo tanto, los cuerpos de agua naturales se hallan en riesgo de ser afectados directamente por su toxicidad como por los efectos indirectos que genera en el agua. Si tenemos en cuenta la aplicación intensiva y recurrente de altas cantidades de glifosato, tanto en la Argentina como en toda la región de América Latina, el ambiente corre peligro de ser afectado por un tiempo bastante prolongado.

Palabras clave: Glifosato, Roundup[®], Glifosato Atanor[®], Perifiton, Mesocosmos, Microcosmos, Comunidades microbianas, Eutroficación, Cuerpos de agua dulce.

IMPACT OF GLYPHOSATE AND SOME COMMERCIAL FORMULATIONS ON FRESHWATER PERIPHYTON

The objective of this thesis is to analyze the effect of glyphosate and some commercial formulations on freshwater periphyton from an integrated and ecological perspective at community and ecosystem scales, through mesocosm and microcosm experiments under laboratory controlled conditions and outdoors. At community level, periphytic community was studied in the laboratory, analyzing possible changes in its structure by the addition of glyphosate technical grade and a formulation. At ecosystem level, the effect of some glyphosate formulations were studied on the periphyton in interaction with other aquatic microbial communities (phytoplankton, bacteria and zooplankton) by analyzing both the structure and functionality as their interactions and with the surrounding abiotic environment. Our results demonstrate that glyphosate significantly alter the structure and function of periphyton, the other microbial communities and water quality in general favoring eutrophication. The effect is direct on the autotrophic communities and extends through the food webs. Glyphosate is not safe for the environment and therefore, natural water bodies are at risk of being affected directly by its toxicity and by the indirect effects that generates in the water. Considering the intensive and recurrent application of high amounts of glyphosate, both in Argentina and throughout Latin America, the environment is in danger of being affected by a rather long time.

Key words: Glyphosate, Roundup[®], Glifosato Atanor[®], Periphyton, Mesocosms, Microcosms, Microbial communities, Eutrophication, Freshwater bodies.

AGRADECIMIENTOS

En principio quiero agradecer a Haydée por ser mucho más que mi directora, por su paciencia, esfuerzo, dedicación y sus valiosas críticas, por transmitirme tantos conocimientos, trabajar junto a mí y brindarme su afecto.

A Guillermo, Haydée, Irina, Inés, Alicia, Rubén, Gabriela, Luz, Rodri, Pato y Paula por haberme permitido en un primer momento ser parte de este excelente grupo de gente y de trabajo.

A Alicia por recibirme con tanta amabilidad en mis inicios en el 95, y por proveerme de cuanta bibliografía le pidiera.

A Haydée, Irina, Luz, Mauro, Rodri, Pato, Euge, Gri, Lau, Matías, Horacio, Gonza, Ana, Leo, Rober, Pepe, Marcela, Guillermo, Carlos, Hernán, María del Carmen, Angela y Mercedes por su ayuda en los experimentos de campo y en el laboratorio.

A Pato por su gran ayuda siempre, por compartir sus conocimientos en general y en particular los de la producción primaria conmigo y por las horas pasadas en el cuarto caliente.

A Rodri por “permitirme” hacer tantas veces los gráficos y los análisis estadísticos del zooplancton. Gracias por ayudarme siempre cuando tengo un problema con la compu.

A Sole y a Gri por la buena predisposición a las consultas referentes al zooplancton.

A Rubén por estar siempre dispuesto a ayudarnos con nuestros problemas estadísticos.

Gracias a Angela por enseñarme la técnica de extracción de pigmentos, por proveerme de tanta bibliografía y porque, aunque sin obligación, leyó y me hizo importantes críticas y aportes al Capítulo 5.

A los “chicos” del labo, Euge, Gabita, Gri, Juan, Laura, Luciana, Luz, Pablo, Pato, Paula, Rodri, Romi, Sole y Vicky por alegrar tantos buenos momentos.

A toda la gente de Chascomús, Horacio, Gonza, Rober, Pepe, Ana, Leo, María, Paulina, Nadia, Marcela y Fernando, que siempre con su calidez y predisposición nos hicieron sentir como en nuestra propia casa.

A María del Carmen, Angela, Bibi, Mercedes, Toli, Paula, María Soledad, Sebastián y el resto de los integrantes de los laboratorios de Enzimología, Estrés y Metabolismo y de Biodiversidad, Ultraestructura y Ecofisiología de Microalgas por ser tan amables y estar siempre predispuestos a ayudarme y prestarme sus equipos y elementos de trabajo.

Gracias a Dani, Malala y Toli por soportarme, por escucharme, por aconsejarme, por quererme, por estar siempre presentes.

AGRADECIMIENTOS

A mi grupo de amigos fruta con los cuales compartí tantas cosas dentro y fuera de la facu, Ami, Connie, Diego, Eze, Guille, Hernán, Inés, Leo, Lida, Luciano, Lucila, Nacho, Shir, Tam y Yani. En orden alfabético para que no se peleen.

A los amigos que van y vienen y a los que siempre están.

Muy especialmente quiero agradecer a mi familia que siempre me apoyó en todo y a la cual adoro. Mis papás, que siempre me incentivaron a más. Mis hermanos, mis cuñados, mis tíos, mis primos y mi madrina.

Y por último, aunque están primeros en mi corazón y en mis pensamientos, gracias a Juan y a Martina por ser mi vida, por ser mi mundo...

A todos, **muchísimas gracias!!!!!!!!!!!!!!**

Esta tesis fue financiada por: CONICET (Beca postgrado tipo I y II) y por los proyectos: (i) "Impacto de las prácticas agrícolas sobre humedales pampeanos" (CONICET PIP 5614), y (ii) "Glifosato en agua dulce: efectos a escalas ecosistema, comunidad y población" (ANPCyT PICT-1104 2006).

A Juan y a Martina

INTRODUCCIÓN GENERAL

La actividad humana ha afectado gravemente los cursos y cuerpos de agua en todo el mundo. Estos han sido sujetos a adiciones de grandes cantidades de aguas residuales domésticas, efluentes industriales, desechos agrícolas, derrames de petróleo, residuos de la minería, escorrentía urbana, materiales radioactivos, pesticidas y gran número de otros contaminantes, frecuentemente porque era considerado conveniente y económico que el agua se lleve los materiales indeseables “fuera de la vista”. En la mayoría de los casos, los efectos de los agentes contaminantes sobre la biota acuática son rápidamente evidentes, pero en otros los efectos son acumulativos y a menudo lo hacen lentamente (Wetzel y Likens 2000).

CONTAMINANTES AMBIENTALES

La contaminación ambiental es una consecuencia indeseable de la actividad humana. Harte *et al.* (1991) han definido a los contaminantes como sustancias que se introducen en el ambiente como resultado, al menos en parte, de las actividades humanas y que producen efectos nocivos sobre los individuos y sobre los demás componentes del ecosistema.

Entre los tóxicos ambientales encontramos compuestos de diversa naturaleza, tales como plaguicidas, metales pesados, solventes y gases, entre otros.

Plaguicidas

Un *plaguicida*, también llamado *pesticida*, es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos y otros organismos plaga en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte (FAO).

Los pesticidas pueden clasificarse, según el organismo blanco, en: herbicidas, insecticidas, fungicidas, rodenticidas, acaricidas, etc.

Herbicidas

Los *herbicidas* son compuestos, generalmente sintéticos, cuyas propiedades físico-químicas facilitan su entrada a la célula de la planta. Son productos fitosanitarios utilizados para combatir el desarrollo de plantas indeseadas, usualmente por razones comerciales, a las que se denominan malezas (Nicholls y Altieri 1997). Las malezas reducen seriamente la productividad de las plantas de cultivo mediante la competencia por el agua, los nutrientes y la luz y además, pueden albergar enfermedades e insectos (Franz *et al.* 1997).

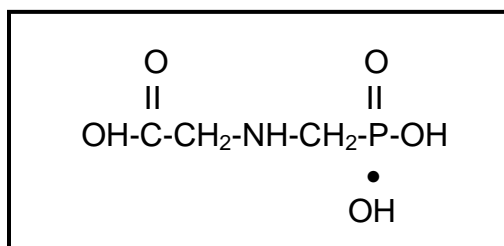
Existen básicamente, dos maneras de aplicar los herbicidas: directamente al suelo (pre-emergentes) o directamente a la planta (post-emergentes). Los herbicidas *pre-emergentes* se aplican sobre o dentro del suelo y combaten las malezas a medida que germinan o crecen a partir de semillas en el suelo. Los *post-emergentes* se aplican a las hojas u otra parte de las plantas que ya han emergido del suelo (Franz *op. cit.*).

Por otro lado, los herbicidas post-emergentes se clasifican según cómo ingresan a la planta blanco. Los *herbicidas de contacto* matan sólo aquella parte de la planta que ha entrado en contacto con el herbicida luego de un rociado post-emergente. La fitotoxicidad por contacto es de rápida acción; usualmente estos herbicidas matan rápidamente las partes de la planta afectadas. Por su parte, los *herbicidas sistémicos* generalmente son más lentos en su acción y se van translocando a través del sistema vascular de la planta hasta los meristemas (puntos de crecimiento) tanto sobre como debajo del suelo. Este tipo de herbicida es más efectivo en la destrucción total de malezas persistentes. Un herbicida que es fitotóxico para las malezas pero no para el cultivo en el que se lo utiliza se denomina *selectivo* (Franz *op. cit.*).

GLIFOSATO

El glifosato (N-(fosfometil)glicina) pertenece al grupo de los herbicidas organofosforados y se ha convertido en el herbicida más importante y más ampliamente utilizado en todo el mundo (Woodburn 2000).

Es un aminofosfonato análogo del aminoácido natural glicina, cuyo nombre es una contracción de *glicina*, *fos-* y *-ato*. Su fórmula molecular es $C_3H_8NO_5P$ (Gimsing y dos Santos Afonso 2005), y su fórmula estructural (Thomson 1993):



El glifosato es un herbicida post-emergente, sistémico, no selectivo y de amplio espectro de actividad hacia las plantas, que es utilizado tanto en áreas agrícolas como no agrícolas para eliminar malezas indeseables, pastos anuales y perennes, hierbas de hoja ancha, especies leñosas, plantas herbáceas, matorrales y algunas coníferas (Goldsborough y Brown 1988).

El glifosato carece prácticamente de actividad herbicida pre-emergente debido a que es rápida y fuertemente adsorbido a la mayoría de los suelos (Franz *et al.* 1997).

Descubrimiento del glifosato

Las propiedades herbicidas del glifosato fueron descubiertas en Monsanto Agricultural Products Company en 1970 por el Dr. John E. Franz. Fue introducido en el mercado mundial como un nuevo herbicida comercial en 1974 y en la actualidad es vendido en por lo menos 140 países para más de 100 aplicaciones agrícolas, industriales y residenciales (Franz *et al.* 1997).

Mecanismo de acción del glifosato

Para usos comerciales, los métodos típicos de aplicación del glifosato involucran el rociado de soluciones acuosas a través de equipamientos mecánicos terrestres, con rociadores de mano o mediante la utilización de avionetas de fumigación (Giesy *et al.* 2000).

El glifosato es absorbido por la planta principalmente a través de las partes aéreas, tallos y hojas, y se mueve por el floema para ser rápidamente translocado a lo largo de toda la planta. Tiende a acumularse en las regiones meristemáticas de las plantas tratadas para actuar sobre el sistema enzimático. Los síntomas fitotóxicos más comunes del glifosato que se pueden observar son clorosis foliar seguida de necrosis, y la muerte de la planta puede requerir de varios días o semanas. Sin embargo, los efectos bioquímicos pueden ser observados mucho más rápido, unas horas después de aplicado el herbicida (Franz *et al.* 1997).

El principal mecanismo de acción del glifosato es inhibir la actividad de la 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), una enzima cloroplástica de la vía metabólica del shikimato para la biosíntesis de corismato (Fig. 1). Esta ruta se

INTRODUCCIÓN GENERAL

encuentra en todas las plantas y microorganismos pero no en animales. Este mecanismo de acción bioquímico, sobre esta enzima en particular, es sólo conocido para los herbicidas que contienen glifosato (Franz *et al.* 1997). La EPSPS cataliza la reacción entre el shikimato-3-fosfato (S3P) y el fosfoenolpiruvato (PEP) para formar 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (EPSP). El glifosato actúa como un inhibidor competitivo ocupando el lugar del PEP en el complejo enzimático, y en última instancia impidiendo la síntesis de corismato. El corismato es requerido para la biosíntesis de una amplia variedad de metabolitos aromáticos de las plantas, incluidos los aminoácidos aromáticos esenciales (fenilalanina, tirosina y triptofano) (Giesy *et al.* 2000). Por lo tanto, el glifosato provoca la inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos, seguida de la reducción en la síntesis de proteínas y otras moléculas que los requieren como precursores (Salisbury y Ross 1994), disminución del crecimiento y muerte celular prematura (Lydon y Duke 1988).

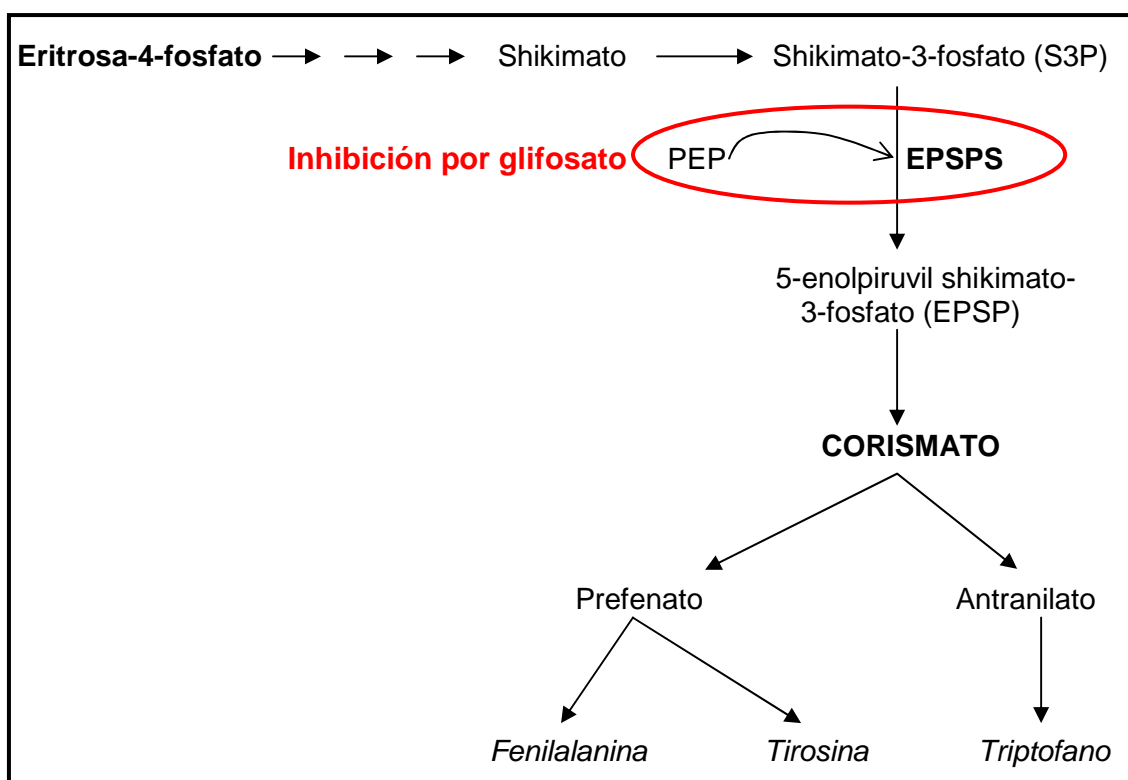


Figura 1. Esquema de la vía metabólica del shikimato y mecanismo de acción del glifosato en plantas. El glifosato actúa como un inhibidor competitivo ocupando el sitio del PEP en el complejo enzimático. Adaptado de Giesy *et al.* (2000).

Además de su modo principal de acción, se conoce que el glifosato perjudica un número de estructuras celulares y otros procesos bioquímicos, como ser la

disrupción de cloroplastos, membranas y paredes celulares, altera la síntesis de ácidos nucleicos, la fotosíntesis y la respiración, y reduce la síntesis de clorofilas y compuestos que contienen porfirinas (*e.g.*, Ali y Fletcher 1978, Campbell *et al.* 1976, Hernando *et al.* 1989, Schaffer y Sebetich 2004). Aunque no se ha establecido aún si estos efectos son primarios o secundarios (Duke 1988, Hoagland y Duke 1982).

Formulados de glifosato

El glifosato no puede penetrar *per se* en las malezas blanco, razón por la cual necesita la presencia de coadyuvantes que actúen disminuyendo la tensión superficial de las cutículas de las plantas y aumenten la permeabilidad. Es por esta razón que lo que efectivamente se utiliza son los formulados que contienen como principio activo al glifosato, generalmente en forma de sal de isopropilamina, uno o varios surfactantes y agua. Los formulados pueden variar en la concentración del componente activo y en el tipo y concentración de surfactante o coadyuvante agregado (Giesy *et al.* 2000). La concentración de glifosato en los formulados se encuentra expresada comúnmente por ingrediente activo (i.a.), que es la sal de isopropilamina, o por equivalentes de ácido (e.a.), y se asume que 1 mg i.a. contiene 0,75 mg e.a. (Giesy *op. cit.*).

El primer formulado introducido al mercado mundial por Monsanto en el año 1974 fue el Roundup[®]. Éste contiene 480 g de ingrediente activo (equivalentes a 360 g e.a.) por litro y como aditivo, el agente surfactante polioxietileno amina (POEA), que es un preparado sintético derivado de ácidos grasos animales, y que ayuda a la penetración del glifosato a través de la cutícula de las plantas tratadas (Franz *et al.* 1997, Giesy *et al.* 2000).

Las formulaciones más utilizadas en Argentina se basan en concentrados solubles granulados con agregados de coadyuvantes siliconados con concentraciones del principio activo desde un 66 a un 79% y es del 48% cuando el formulado no posee coadyuvante (CNIA-CONICET 2009). Una de las principales formulaciones de glifosato utilizadas actualmente en la región central de la llanura pampeana, principalmente por su precio y concentración, es el Glifosato Atanor[®]. Este formulado contiene 48% p/v de la sal de isopropilamina, siendo el resto tensioactivos y agua. Los tensioactivos particulares de la formulación no se encuentran especificados en la etiqueta del producto, siendo según Vigil *et al.* (2004) seleccionados entre aquellos compuestos pertenecientes a una lista de familias químicas, por ejemplo, alkanolamidas, alquil aril sulfonatos, aminas y amidas sulfonatadas, alquilfenoles etoxilados, ácidos grasos etoxilados, alcoholes sulfatados y etoxilados, derivados del sorbitol, ésteres de fosfato, entre muchas otras.

En la actualidad, hay más de 100 tipos distintos de formulados registrados, tales como: Roundup Pro[®], Glifosato Atanor[®], Accord[®], AquaMaster[™], Rodeo[®], Rondo[®], Glypro[®], Glypro Plus[®], Touchdown[®] entre otros, de los cuales se carece de la información completa sobre la composición del producto, que incluye “elementos inertes” de características desconocidas.

El glifosato en el mundo

El glifosato fue registrado originalmente para utilizar en determinados sistemas de producción no agrícolas, huertas, viñedos y situaciones industriales (Dill 2005, Woodburn 2000). Pero tal vez el aspecto más importante para el éxito del glifosato fue la introducción, en el año 1996, de los primeros cultivos biotecnológicos o genéticamente modificados (GM), los cuales presentaban tolerancia al glifosato. En ese año sólo 6 países, entre ellos Argentina, eran productores de estos cultivos, con 1,7 millones de hectáreas cultivadas en todo el mundo. En el año 2009, 134 millones de hectáreas fueron plantadas (80 veces más que en 1996) en 25 países con distintos cultivos genéticamente modificados (Fig. 2), y según Duke y Powles (2008) alrededor del 90% de todos estos cultivos biotecnológicos son tolerantes al glifosato.

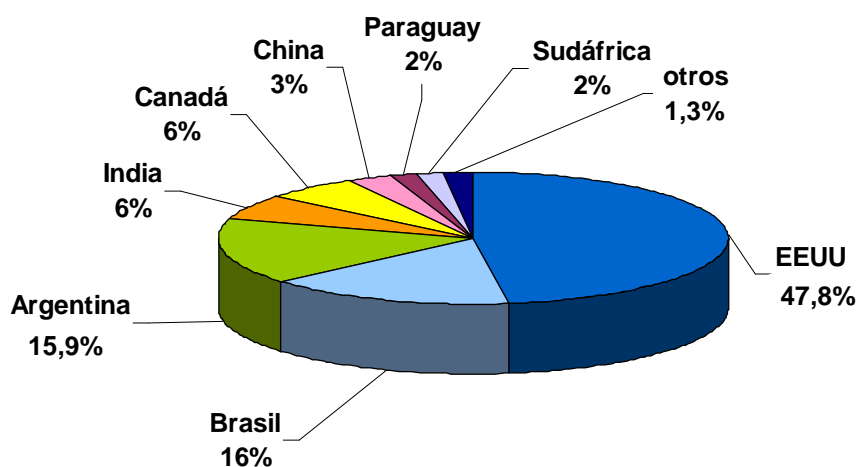


Fig. 2. Área global cultivada con organismos genéticamente modificados, porcentaje por país (sobre una base de 134 millones de hectáreas) en el año 2009. En “otros” se incluyen: Uruguay, Bolivia, Filipinas, Australia, Burkina Faso, España, Méjico, Chile, Colombia, Honduras, República Checa, Portugal, Rumania, Polonia, Costa Rica, Egipto y Eslovaquia. Fuente: James (2009).

La soja tolerante al herbicida glifosato (soja Roundup Ready o soja RR) fue el primer cultivo GM introducido en el mercado mundial en 1996 (Dill 2005). En el 2008, 13 años después, solamente este cultivo ocupó el 53% del área global cultivada con

INTRODUCCIÓN GENERAL

organismos GM. Luego de la soja RR se desarrollaron el algodón, el maíz, la canola, la alfalfa y la remolacha azucarera tolerantes al glifosato (Dill *et al.* 2008).

Según la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) de Argentina, el glifosato es el producto fitosanitario (es decir, de protección de los cultivos) más usado en el mundo, del cual se consumen anualmente más de 2000 millones de litros.

El glifosato en la Argentina

La Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) define *evento de transformación genética*, o simplemente *evento* a "la inserción en el genoma original, de manera definida y controlada, de una construcción definida de ADN nuevo (incluye a los genes de interés, los elementos que controlan su expresión, los genes marcadores de selección y otras secuencias de ADN)". Los eventos de transformación son únicos, y difieren en los elementos y genes insertados, los sitios de inserción en el genoma original, el número de copias del inserto, los patrones y niveles de expresión de las proteínas de interés, etc. En la tabla 1 se muestra la lista de eventos aprobados en Argentina.

Cultivo	Característica introducida para tolerar:	Año de aprobación
Soja	al herbicida glifosato	1996
Maíz	a insectos lepidópteros	1998
Maíz	al herbicida glufosinato de amonio	1998
Algodón	a insectos lepidópteros	1998
Maíz	a insectos lepidópteros	1998
Algodón	al herbicida glifosato	2001
Maíz	a insectos lepidópteros	2001
Maíz	al herbicida glifosato	2004
Maíz	a insectos lepidópteros y al herbicida glufosinato de amonio	2005
Maíz	al herbicida glifosato	2005
Maíz	al herbicida glifosato y a insectos lepidópteros	2007
Maíz	a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio y a insectos lepidópteros	2008
Algodón	al herbicida glifosato y a insectos lepidópteros	2009
Maíz	al herbicida glifosato y a insectos lepidópteros	2009
Maíz	a insectos lepidópteros	2010
Maíz	a insectos coleópteros y al herbicida glifosato	2010
Maíz	a insectos lepidópteros y coleópteros y al herbicida glifosato	2010

Tabla 1. Eventos aprobados en Argentina para su siembra, consumo y comercialización. Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Desde 1996 al 2009, el área plantada en Argentina con cultivos biotecnológicos ha aumentado desde 370 mil ha hasta 21,3 millones de ha (15,9% del área total mundial). En el año 2009 Brasil desplazó a la Argentina del segundo al tercer lugar en superficie plantada con cultivos GM en el mundo (James 2009).

El primer cultivo genéticamente modificado incorporado a la agricultura argentina fue la soja tolerante al glifosato, la cual fue aprobada en el año 1996 (Trigo y Cap 2006). Actualmente, el 58,7% de la superficie total sembrada en el país (31,2 millones de ha en la campaña agrícola 2009/2010) es destinada a la soja (18,3 millones de ha, Fig. 3a, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca) siendo casi el 100% del cultivo tolerante al glifosato (Fig. 3b, James 2009).

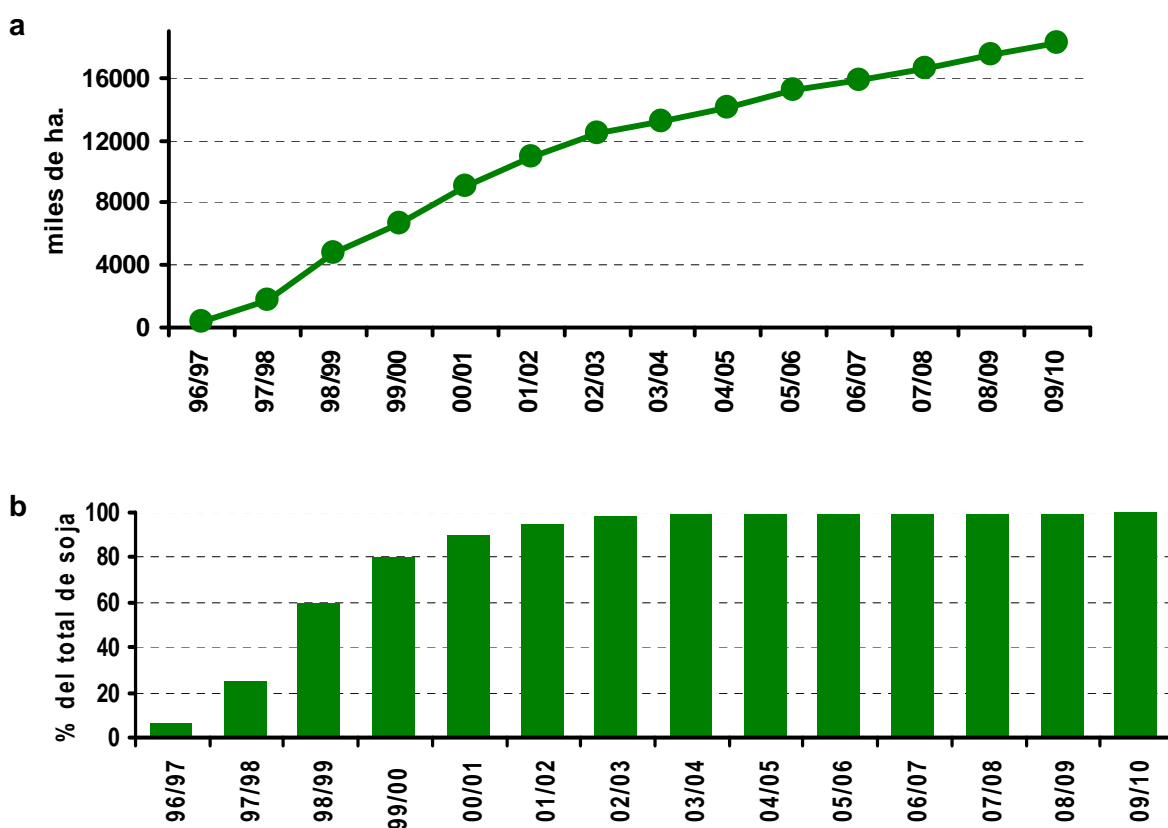


Fig. 3. Evolución de la superficie de soja RR en Argentina: **(a)** en miles de hectáreas cultivadas y **(b)** como porcentaje de la superficie total sembrada con soja. Tomado de ArgenBio.

Luego de la soja RR se incorporaron en el país, el algodón y el maíz transgénicos. Durante la campaña 2009/2010, el algodón genéticamente modificado ocupó el 97% del área total del cultivo. De la superficie total sembrada con algodón, el 10% (47 mil ha) correspondió a algodón tolerante a glifosato y el 78% a variedades

con características acumuladas (tolerancia a insectos y a glifosato, 367 mil ha) (Fig. 4a). El maíz transgénico ocupó el 83% del área destinada a maíz. Con respecto a éste, en 2009/2010 Argentina sembró maíz tolerante a herbicidas (siendo casi todo tolerante al glifosato) en 256 mil ha (el 8% del total de maíz) y con características acumuladas (tolerancia a insectos y a herbicidas) en 992 mil ha (el 31% del total) (Fig. 4b, ArgenBio).

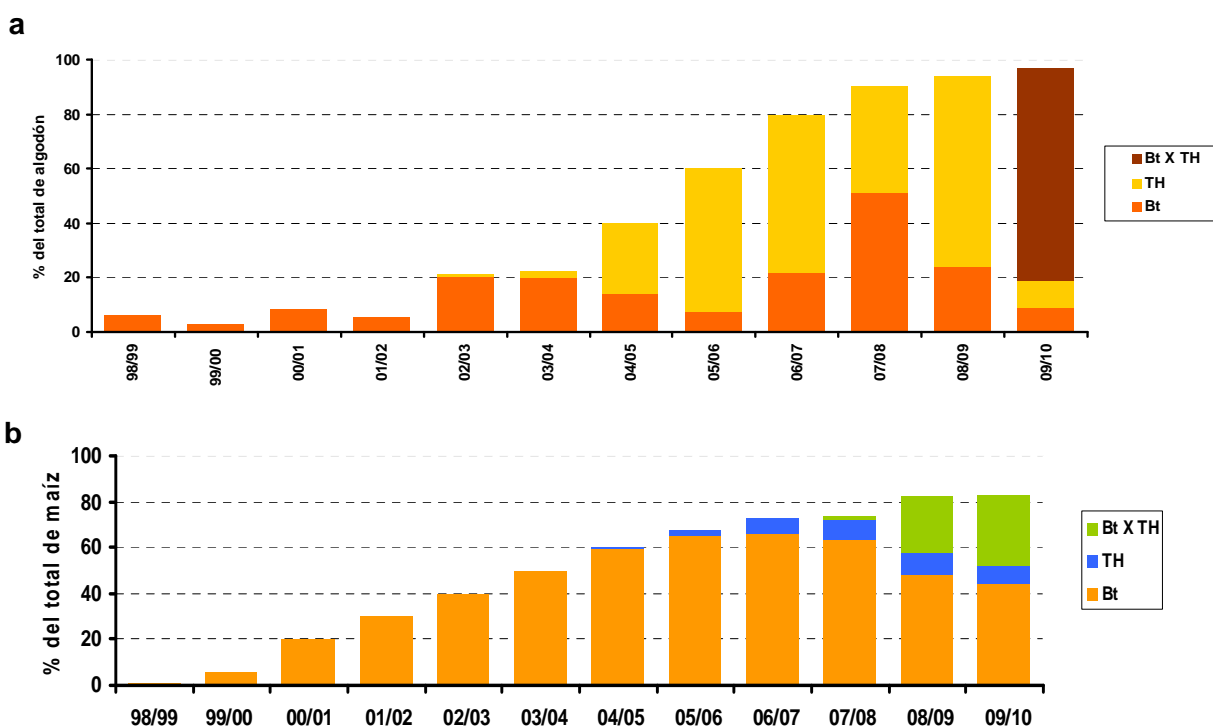


Fig. 4. Evolución de la superficie de **(a)** algodón y **(b)** maíz transgénicos, como porcentajes de la superficie total sembrada de cada cultivo. TH: tolerancia a herbicidas, Bt: tolerancia a insectos y Bt X TH: ambas características acumuladas. Tomado de ArgenBio.

En el país, el glifosato no sólo es utilizado para la soja, el maíz y el algodón, también se lo aplica en la práctica del barbecho. Esta práctica agrícola comprende tratamientos con herbicidas que se utilizan en el período comprendido entre dos cultivos de verano, cuyo objetivo final es el control de las malezas y la preservación de la humedad y los nutrientes del suelo para poder ser aprovechados por el cultivo posterior. Esta técnica viene de la mano de la implementación de la siembra directa o labranza cero, que consiste básicamente en depositar la semilla en el suelo a la profundidad requerida con un mínimo de perturbación de la estructura edáfica, utilizando maquinaria específicamente diseñada a tal efecto que elimina el uso del arado y minimiza el laboreo requerido para evitar la pérdida de agua en la implantación

del cultivo (Trigo *et al.* 2002). En la actualidad el uso de glifosato en la práctica del barbecho químico supera al uso en la soja RR, representando el 35% del consumo de glifosato total en el país. El porcentaje de utilización de glifosato en soja es de 31%, en maíz 9% y en tercer lugar se encuentra la producción de frutales de pepita con el 4,3% (CNIA-CONICET 2009). Estas circunstancias llevaron a la Argentina a utilizar más de 170 millones de kg/litro de glifosato (el 84,7% de la cantidad total consumida de herbicidas) durante el 2009, siendo este valor el 8,5% del consumo total de glifosato en el mundo (CASAFE 2010).

Durante el 2009, las ventas de glifosato en el país superaron los 550 millones de dólares (42,3% del total invertido en pesticidas), de los cuales el 47,5% estuvo destinado a la práctica del barbecho químico y casi el 46% a la soja (CASAFE 2010).

Interacciones del herbicida en el suelo

Debido a los diferentes métodos de aplicación del herbicida y a las diferentes condiciones ambientales (lluvia, viento, etc.), una cantidad significativa de glifosato aplicado alcanza el suelo. En el suelo, los herbicidas pueden unirse a los constituyentes del suelo, ser transportados de la zona de contacto y ser degradados mediante diferentes mecanismos (Fig. 5, Franz *et al.* 1997).

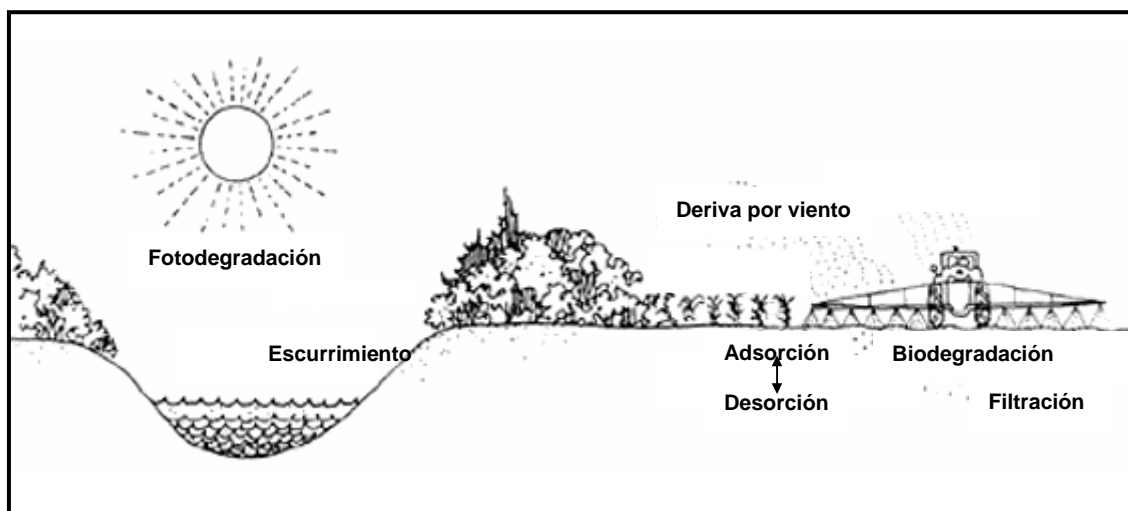


Fig. 5. Esquema con las posibles interacciones del glifosato en el suelo y en el agua.

En condiciones de campo se asume que el glifosato es rápida y fuertemente adsorbido a las partículas del suelo. A menudo la adsorción es un proceso de equilibrio, por lo tanto la unión es usualmente reversible (Franz *et al.* 1997). El glifosato está unido al suelo a través de su ácido fosfónico, ya que la adición de fósforo

inorgánico puede potencialmente liberar el glifosato de las partículas del suelo (Sprankle *et al.* 1975a, b) a través de la competencia por los sitios de sorción (Franz *et al.* 1997, Gimsing y dos Santos Afonso 2005). Este herbicida interactúa en el suelo formando fuertes complejos con metales disueltos, óxidos de metal y arcillas (Gimsing y dos Santos Afonso 2005).

El transporte (filtración y escurrimiento) de un herbicida a través del suelo está mediado por el agua, por lo tanto, el destino del glifosato va a depender fuertemente de sus propiedades físico-químicas en el medio acuático, por ejemplo de su solubilidad en agua, de su potencial para formar complejos con metales (Gimsing y dos Santos Afonso 2005) y de la adsorción a los constituyentes del suelo (Glass 1987, McConnell y Hossner 1989). Debido a su alta afinidad por las partículas del suelo, por lo general se cree que su movilidad en los suelos blanco, ya sea por filtración o escurrimiento hacia aguas subterráneas o superficiales, respectivamente, es insignificante (Duke *et al.* 2003, Roy *et al.* 1989). Sin embargo, los desplazamientos del glifosato fuera de la zona de aplicación han sido citados en la literatura (Edwards *et al.* 1980, Kjær *et al.* 2005). Maitre *et al.* (2008, 2010) han detectado una cierta capacidad de desorción en suelos, lo que permitiría, en ciertas condiciones de precipitaciones abundantes, filtrar a través del suelo con la consiguiente contaminación de los mismos.

La disipación del glifosato de los suelos es mayormente debido a la biodegradación, mediada por microorganismos, principalmente por bacterias y hongos. Existen documentadas dos vías de descomposición en suelo (Fig. 6). En la principal ruta metabólica, el glifosato es degradado a ácido aminometil fosfónico (AMPA) que luego es metabolizado a dióxido de carbono (Cox 1995, Rueppel *et al.* 1977). La ruta secundaria involucra el clivaje de la unión C-P para dar sarcosina y fosfato inorgánico, habiéndose observado esta vía sólo con bacterias del suelo aisladas en ausencia de otras fuentes de fósforo (Dick y Quinn 1995, Liu *et al.* 1991, Pipke *et al.* 1987, Shinabarger y Braymer 1986). Procesos de degradación abióticos como la fotólisis y la hidrólisis en el suelo contribuyen poco a la disipación del glifosato en el ambiente (Nomura y Hilton 1977, Rueppel *et al.* 1997, Sprankle *et al.* 1975b).

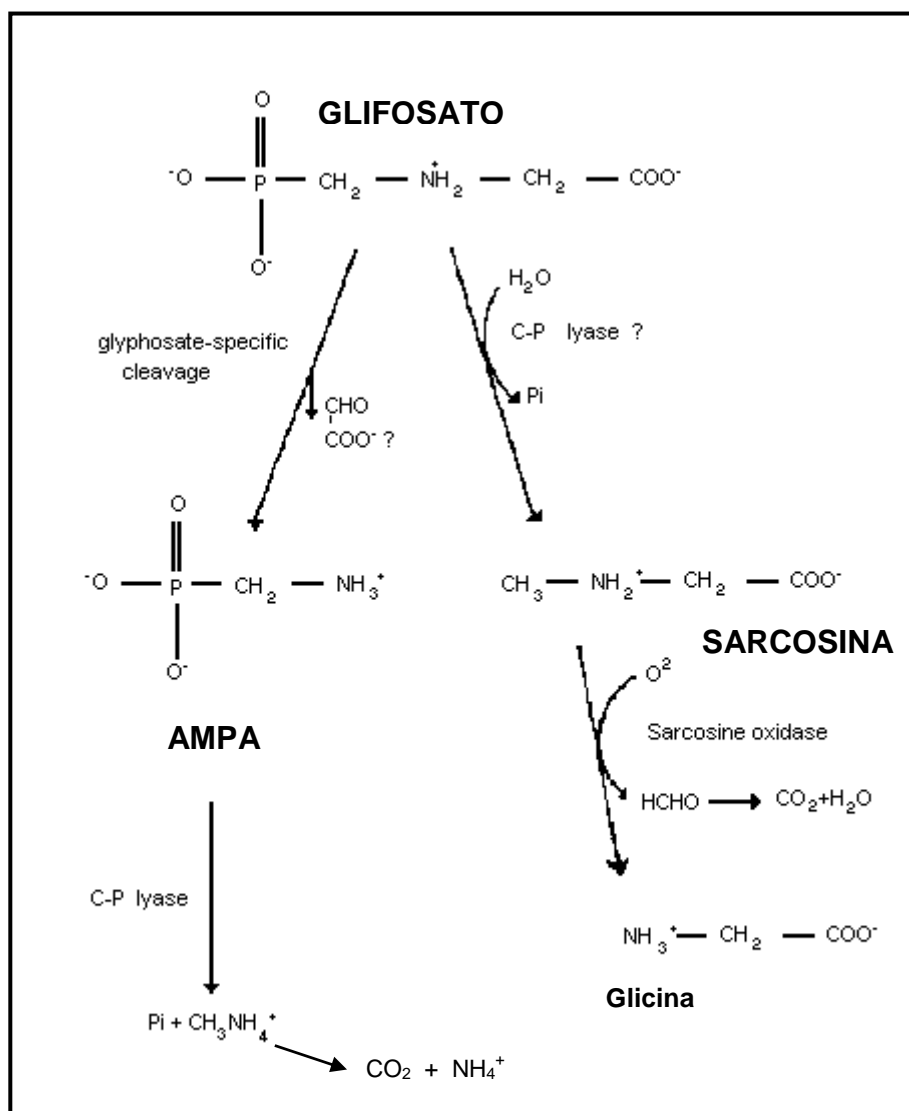


Fig. 6. Vías de descomposición del glifosato en el suelo (tomado y modificado de Liu *et al.* 1991)

La vida media del glifosato en los distintos suelos es muy variable, desde un día hasta años, y estas variaciones han sido explicadas por diferencias en la capacidad de adsorción y el nivel de actividad microbiana del suelo (Carlisle y Trevors 1988, Eberbach 1998). Tortensson (1985) realizó una revisión de estudios de degradación del herbicida y reveló valores de vida media entre 3 días y 22,8 años. Giesy *et al.* (2000) resumieron valores de DT₅₀ (tiempo de disipación del 50% del pesticida agregado) en distintos tipos de suelo y mostraron un rango desde 1,2 a 197,3 días.

Interacciones en el agua

El glifosato puede llegar indirectamente a los sistemas acuáticos por deriva del herbicida durante su aplicación, ya sea accidental o por efecto del viento (Marrs *et al.* 1989, 1993, Payne 1992), o por la escorrentía o escurrimiento de los campos de cultivo, adherido a las partículas del suelo en suspensión (Bowmer 1982, Feng *et al.* 1990, Goldsborough y Beck 1989, U.S. Environmental Protection Agency 1993) (Fig. 5). Edwards *et al.* (1980) registraron importantes cantidades de glifosato en la escorrentía de precipitaciones naturales luego del tratamiento con Roundup® en los suelos de campos de cultivo destinados a siembra directa. La mayor concentración del herbicida en el agua de escorrentía (6,9 mg i.a./litro) fue encontrada 1 día después del tratamiento a la mayor tasa (8,6 kg/ha de Roundup®) (Edwards *et al.* 1980).

El glifosato puede contaminar directamente a los cuerpos de agua si se lo emplea para el control de las macrófitas acuáticas (Major *et al.* 2003) o mediante el lavado de los tanques de las máquinas fumigadoras en los arroyos o cuerpos de agua someros cercanos a los campos de cultivo.

En los cuerpos de agua naturales el glifosato es removido por la degradación microbiana (Zaranyika y Nyandoro 1993) y/o por la adsorción a las partículas en suspensión, inactivándose al formar complejos insolubles con aluminio, hierro, calcio y magnesio (Barja *et al.* 2001) y/o por adsorción sobre la superficie de minerales componentes de los sedimentos (Barja y dos Santos Afonso 2005; Pessagno *et al.* 2005). Considerando que el glifosato queda adsorbido a los sedimentos sin desaparecer del sistema, su persistencia en el medio puede ser aún mayor que en el agua (Newton *et al.* 1994). Existe evidencia también de que la fotólisis del glifosato puede ocurrir en el agua (Lund-Høie y Friestad 1986). Es importante considerar que el glifosato tendrá una evolución en agua dulce muy variada dependiendo de las características físicas, químicas y biológicas de los sistemas (Goldsborough y Beck 1989).

Los resultados de estudios a campo indican que el 50% de la concentración inicial (vida media) de glifosato en el medio acuático se disipa dentro de un período de tiempo que va desde los pocos días hasta las 2 semanas. Se han citado valores de vida media menores a los 4 días en cuerpos lóticos, como arroyos (Feng *et al.* 1990, Newton *et al.* 1984) y lénticos, como lagunas (Goldsborough y Beck 1989). Sin embargo, Goldsborough y Brown (1993) registraron valores de vida media de hasta 11,2 días en lagunas de bosques boreales tratados con glifosato directamente en forma aérea, siendo la disipación más lenta en aguas alcalinas que en los cuerpos de agua más diluidos. Sobrero *et al.* (2007a) obtuvieron, para un bioensayo de laboratorio, valores de vida media de glifosato en agua mayores a los 10 días,

INTRODUCCIÓN GENERAL

mediando durante este período del ensayo experimental sólo una disminución de entre un 15 y un 34% de la concentración inicial del ingrediente activo. En esta tesis se registraron valores de vida media entre 4,2 y 7,3 días en mesocosmos tratados con Roundup® y un valor de 16,02 días en microcosmos tratados con Glifosato Atanor®.

Según Giesy *et al.* (2000), el primer paso en una evaluación de riesgos es llevar a cabo un estudio en el cual se examine el impacto de un pesticida a los peores escenarios posibles de concentraciones que puedan encontrarse en la naturaleza. Por lo tanto, con respecto a los niveles de glifosato en sistemas naturales de agua dulce, hay que considerar las concentraciones observadas y esperadas bajo las peores condiciones posibles.

Típicamente, en los sistemas lóticos se registran concentraciones menores de pesticidas que en los cuerpos lénticos debido a la acción de lavado de las corrientes. En la Tabla 2 se resumen concentraciones de glifosato encontradas en la naturaleza en sistemas de agua dulce.

Cuerpo de agua monitoreado	Tasa de aplicación (kg i.a./ha)	Concentración en agua (mg i.a./l)	Referencia
Agua de filtración	1,07	$1,24 \times 10^{-4}$	Kjær <i>et al.</i> 2005
	1,92	$2,80 \times 10^{-3}$	
Río		$6,70 \times 10^{-4}$ (NE)	
Efluente de plantas de tratamiento de agua	ND	$1,93 \times 10^{-3}$ (NE)	Popp <i>et al.</i> 2008
Río	ND	$7,40 \times 10^{-4}$ (NE)	Pesce <i>et al.</i> 2008
Efluente de plantas de tratamiento de agua	ND	$2,20 \times 10^{-3}$ (NE)	Kolpin <i>et al.</i> 2006
Río	ND	$4,15 \times 10^{-3}$ (NE)	Hanke <i>et al.</i> 2010
Río	ND	$6,20 \times 10^{-3}$ (NE)	Meyer <i>et al.</i> 2010
Arroyo	ND	$8,70 \times 10^{-3}$ (NE)	Battaglin <i>et al.</i> 2005
Arroyo	ND	$8,70 \times 10^{-3}$ (NE)	Scribner <i>et al.</i> 2003
Agua de filtración	5,70	$1,70 \times 10^{-2}$	Landry <i>et al.</i> 2005
Río, arroyo y humedal	ND	$5,47 \times 10^{-2}$	Struger <i>et al.</i> 2008
Estanques	2,10	$6,00 \times 10^{-2}$	Goldsborough y Brown 1993
Agua de pozo	2 aplicaciones: $1,23 \times 10^{-1}$ y $1,14 \times 10^{-1}$	$6,00 \times 10^{-2}$	Smith <i>et al.</i> 1996
Alcantarilla de drenado pluvial	ND	$9,00 \times 10^{-2}$	Botta <i>et al.</i> 2009
Canal	5,60	$1,05 \times 10^{-1}$	Comes <i>et al.</i> 1976
Arroyo	2,93	$1,33 \times 10^{-1}$	Folmar 1978
Estanque	$8,90 \times 10^{-1}$	$1,41 \times 10^{-1}$	Goldsborough y Beck 1989
Arroyo	2,00	$1,62 \times 10^{-1}$	Feng <i>et al.</i> 1990
Agua de escorrentía	2 aplicaciones: 1,12	$2,43 \times 10^{-1}$	Shipitalo <i>et al.</i> 2008
Estanque	ND	$3,28 \times 10^{-1}$	Battaglin <i>et al.</i> 2009
Arroyo	4,40	$3,60 \times 10^{-1}$	Newton <i>et al.</i> 1984

INTRODUCCIÓN GENERAL

Agua de escorrentía	1,45	$7,36 \times 10^{-1}$	Wood 2001
Estanque y arroyo forestales	5,49	1,65	Newton <i>et al.</i> 1994
Humedal	2,56	2,60	Thompson <i>et al.</i> 2004
Agua de escorrentía	8,96	6,9	Edwards <i>et al.</i> 1980

Tabla 2. Resumen de las concentraciones observadas de glifosato en cuerpos de agua dulce naturales. ND: datos no disponibles.

Relyea (2006) recopila y revisa información de los peores escenarios posibles de concentraciones estimadas de glifosato que pueden encontrarse en agua dulce, con valores de 1,87 mg i.a./litro (gobierno de Canadá), 3,6 mg i.a./l (Solomon y Thompson 2003), 3,7 mg i.a./l (Giesy *et al.* 2000), 3,87 mg i.a./l (Perkins *et al.* 2000) y 10,13 mg i.a./l (Mann y Bidwell 1999).

En Argentina son escasísimos los reportes de concentraciones de glifosato en sistemas naturales de agua dulce. Peruzzo *et al.* (2008) midieron concentraciones del herbicida en cuerpos lóticos cercanos a campos de cultivo de soja del norte de la provincia de Buenos Aires, con valores entre 0,1 y 0,7 mg i.a./litro. Peruzzo *et al.* (2003) realizaron una estimación de concentración esperada de glifosato en el agua de acuerdo al modelo multimedial “Soil Fug” que resultó en un valor máximo de 1,51 mg i.a./litro. Estos autores también realizaron ensayos en laboratorio de escorrentía e infiltración simulando condiciones de campo y obtuvieron niveles máximos de glifosato de 5,9 y 2,7 mg i.a./l para el agua de escorrentía y de 2,9 y 1,1 mg i.a./l en el agua de percolación, valores medidos y estimados por el modelo “Soil Fug”, respectivamente. Concentraciones en el agua del herbicida entre 1,8 y 10,9 mg/l fueron detectadas durante eventos asociados a aplicaciones de glifosato en los sectores cultivados aledaños al Arroyo El Sauce, en la provincia de Buenos Aires (Berkovic *et al.* 2006).

MODELOS PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS DE XENOBIÓTICOS EN EL AMBIENTE ACUÁTICO

Los contaminantes en los cuerpos de agua dulce pueden ser medidos mediante análisis químicos y físicos y/o por sus efectos sobre la biota presente en los alrededores del lugar afectado (Sweeting 1994).

La instrumentación para monitorear cuerpos de agua, incluyendo sondas químicas ión-específicas y “data loggers” que registran información en forma continua, ha sido desarrollada hasta el punto en el cual gran cantidad de productos químicos potencialmente influyentes pueden ser monitoreados a bajo costo y de forma continua. Sin embargo, la accesibilidad al equipamiento de monitoreo químico puede ser difícil

en algunas situaciones (por ejemplo, pequeñas industrias y municipios) y al mismo tiempo, dejar ese equipamiento en el campo implica un riesgo, ya sea por vandalismo o robo. Además, algunos ecosistemas acuáticos se encuentran en áreas remotas, donde el transporte y la colocación de equipos de monitoreo químico continuo no es práctico. Así mismo, aún el permanente monitoreo químico y registro de datos mediante “data loggers” puede perderse eventos que tienen la posibilidad de impactar seriamente sobre miembros clave de la comunidad biológica. Así también, es difícil predecir de esta manera, la influencia de la interacción y el sinergismo y/o antagonismo de combinaciones de químicos en la biota acuática (Lowe y Pan 1996).

Al evaluar la calidad de las aguas, es conveniente complementar el análisis de las variables físicas y químicas del ambiente con estudios biológicos. Estos últimos incluyen desde la evaluación de los efectos de los contaminantes sobre la morfología y/o fisiología de organismos hasta sobre las propiedades de las comunidades biológicas (Whitton 1975) y pueden ser llevados a cabo bajo condiciones de laboratorio o a campo. Los bioindicadores resumen la “historia” toxicológica de un sitio, develando con su presencia o ausencia o con sus cambios a nivel individuo, población o comunidad la complejidad del sitio afectado.

La utilización de algas como indicadores ecotoxicológicos tiene sus orígenes en el análisis de la respuesta de algas planctónicas en cultivo, en particular especies muy conocidas como *Scenedesmus quadricauda*, *Selenastrum capricornutum* o *Chlorella* sp. Estas especies crecen rápidamente en el laboratorio y son contabilizadas fácilmente, por lo tanto son convenientes para los bioensayos. Considerando que su crecimiento puede verse afectado por la luz, la temperatura y el nivel de nutrientes, se requieren condiciones estándar que han sido ampliamente aplicadas (Sabater *et al.* 2007). Los cultivos de algas han sido utilizados, por ejemplo, para detectar efectos de herbicidas (Vendrell *et al.* 2009), efectos combinados de herbicidas y surfactantes (Altenburger *et al.* 1990) o en la evaluación de los riesgos de las mezclas de productos químicos (Faust *et al.* 2001). Si bien la ecotoxicología de poblaciones, basada principalmente en ensayos de laboratorio, provee información muy útil sobre la relación concentración xenobiótico/respuesta, es la ecotoxicología de comunidades la que integra las respuestas de numerosas poblaciones y sus interacciones, permitiendo predecir con mayor realismo los efectos, ya sean directos o indirectos, de la exposición a tóxicos en los sistemas naturales (Källqvist *et al.* 1994, Sabater *et al.* 2007). Un determinado factor ambiental puede no estar actuando en un momento dado y sin embargo la presencia o ausencia de ciertas asociaciones específicas de especies pueden revelar su efecto en un pasado cercano (Margalef 1969).

Si el objetivo principal del monitoreo biológico es determinar el impacto de contaminantes en las comunidades acuáticas, es factible en algunas situaciones satisfacer esta meta mediante experimentos controlados utilizando mesocosmos artificiales (Genter *et al.* 1987) los que se consideran un nivel intermedio entre los ensayos de laboratorio y los de campo. En la práctica, los ecotoxicólogos han definido a los mesocosmos como ecosistemas semicontrolados de gran tamaño ($> 1 \text{ m}^3$) al aire libre, tales como estanques y flujos experimentales, cuyas dimensiones físicas y propiedades químicas del agua son conocidas y controladas (Boyle y Fairchild 1997). El uso de mesocosmos hace posible controlar muchas variables que pueden influenciar, como los recursos y las interacciones entre poblaciones, que tienen el potencial de adicionar “ruido” en experimentos donde una sola variable química está siendo manipulada (Lowe y Pan 1996). Los estudios con mesocosmos artificiales han contribuido grandemente en el conocimiento del impacto de metales (Genter *et al.* 1987), pesticidas (Fairchild y Sappington 2002), nutrientes (Bothwell 1985, Pan y Lowe 1994) y variables físicas (Maurice *et al.* 1987) en los ecosistemas acuáticos. Se pueden construir varios mesocosmos, ecológicamente realistas y replicables, con relativamente poco dinero en un lugar pequeño (Pan y Lowe 1994), mejorando así el poder estadístico predictivo de dichos ensayos. Los mesocosmos artificiales tienen la ventaja adicional de determinar el impacto de tóxicos ambientales en un sitio controlado en lugar de poner en riesgo un cuerpo de agua natural (Lowe y Pan 1996). Los experimentos en mesocosmos constituyen una herramienta de evaluación muy valiosa que complementan los estudios de toxicidad monoespecíficos convencionales, llevando a la experimentación un paso más cerca de la naturaleza (SETAC-RESOLVE 1992).

En un continuo experimental, desde los ensayos de laboratorio con una única especie hasta estudios a escala ecosistémica utilizando por ejemplo mesocosmos artificiales al aire libre, podemos colocar en un lugar intermedio a los microcosmos. Éstos son unidades experimentales de menor tamaño ($< 1 \text{ m}^3$) que pueden ser tanto interiores como exteriores, y en los que se pueden desarrollar ensambles biológicos controlados o naturales (Boyle y Fairchild 1997). Existe gran variedad de estudios en microcosmos que analizan los efectos de pesticidas sobre comunidades acuáticas microbianas, tanto al aire libre (Daam *et al.* 2009, Rand 2004) como en laboratorio (Schmitt-Jansen y Altenburger 2005, Van den Brink *et al.* 2009), utilizando comunidades artificiales (Taub 1997, van Wijngaarden *et al.* 2010) y naturales (Pérès *et al.* 1996, Pratt *et al.* 1997). Los estudios en mesocosmos al aire libre pueden ver, sus resultados solapados con otros factores naturales que no son los agentes tóxicos de interés, mientras que los microcosmos aportan mayor simplicidad, controlabilidad y

replicabilidad biótica y abiótica (Fuma *et al.* 2009) en detrimento de su extrapolabilidad a condiciones naturales.

El perifiton

La microbiota puede crecer sobre y adherida a cualquier superficie inmersa o creciendo en el agua. La sucesión de microorganismos sobre un sustrato es compleja e involucra la adsorción de sustancias orgánicas a las superficies y la fijación de microorganismos en secuencia. Usualmente las bacterias se fijan primero, seguidas de las algas, cianobacterias y protistas. Materiales mucilaginosos extracelulares a menudo se presentan como proyecciones o capas en torno a las células microbianas. Por último, este material forma una matriz habitada por una gran variedad de microorganismos, particularmente bacterias, algas, protistas y hongos (Wetzel 2001). La terminología que define a la comunidad microbiana sumergida y adherida a un sustrato es amplia y ha cambiado a lo largo del tiempo. El término *bentos* (del griego “fondo”) fue en principio definido para incluir el ensamble de organismos asociados al fondo o a cualquier interfase sólido-líquido en los sistemas acuáticos. Actualmente, *bentos* se utiliza casi exclusivamente para los animales asociados con los sustratos del fondo (Wetzel *op. cit.*). La expresión alemana *Aufwuchs* que significa “crecer sobre”, generalmente connota todos los organismos adheridos, pero que no penetran, a una superficie sumergida, aunque ahora casi no se la utiliza en la literatura moderna (Azim *et al.* 2005, Stevenson 1996). El término *biofilm* es utilizado más frecuentemente en aplicaciones de ingeniería refiriéndose a comunidades bacterianas heterotróficas adheridas (Wetzel 2001).

A pesar de ser etimológicamente impreciso, el término *perifiton* (del griego “cerca de plantas”) es tan utilizado en la limnología que su uso ha sido internacionalmente aceptado (Wetzel 2001). Aquí se empleará la definición del término propuesta por Wetzel (1983): “El perifiton es una compleja comunidad de microbiota (algas, bacterias, hongos, animales y detritos inorgánico y orgánico) que se adhiere a un sustrato sumergido inorgánico u orgánico, vivo o muerto”.

El perifiton puede ser clasificado según el hábito de sus componentes en *euperifiton*, organismos inmóviles adheridos a un sustrato por medio de rizoides, pies gelatinosos, o algún otro mecanismo, y en *pseudoperifiton* o *metaperifiton*, organismos de vida libre, móviles que se arrastran entre o dentro del euperifiton (Weitzel 1979). Existe también distinta terminología para denominar al perifiton, dependiendo del sustrato donde crece: se llamará *epifiton* si la comunidad se encuentra adherida a plantas acuáticas, *epipelon* si el sustrato es sedimento limoso, *epixilon* cuando se trata de madera, *epiliton* para sustrato rocoso, *epipsammon* para arena, etc. (Azim *et al.*

2005). El metabolismo, crecimiento y productividad de la comunidad dependen en gran parte del reciclado interno y de la conservación de los recursos capturados externamente, resultando así en una alta eficiencia de utilización y retención de los mismos (Wetzel 1983). La materia orgánica producida por los productores primarios del perifiton es degradada por las bacterias y protistas dentro de la misma comunidad siendo los nutrientes liberados al medio o activamente secuestrados y retenidos por los propios componentes de la comunidad perifítica.

Uno de los mayores problemas para estudiar las relaciones estructurales y funcionales en el perifiton está centrado en la metodología empleada para tomar las muestras. La heterogeneidad de los sustratos naturales con respecto a la superficie, la composición y la textura, la forma, tamaño y orientación, su inmersión intrínseca y la profundidad a la que se encuentran lleva a inconvenientes a la hora de realizar mediciones cuantificables (Austin *et al.* 1981). Sand-Jensen y Borum (1991) señalan que la comunidad adherida está generalmente distribuida de manera muy heterogénea y es difícil de cuantificar en términos absolutos cuando se trabaja con sustratos naturales. Por otro lado, existe la posibilidad de interacción entre la comunidad adherida y el sustrato. Las propiedades físicas y químicas de los distintos tipos de sustratos pueden afectar las propiedades de la comunidad perifítica (Burkholder 1996, Pringle 1990). Las rocas, por ejemplo, dependiendo de su composición química y otras características pueden ser una fuente de nutrientes para las algas asociadas (Burkholder 1996, Hiebert y Bennett 1992) y son sustratos físicamente más estables que los sedimentos no consolidados o las macrófitas (Vadeboncoeur y Lodge 2000). Las interacciones macrófita-epífitas pueden ser positivas (simbiosis o mutualismo), negativas (competencia) o neutras (Goldsborough *et al.* 2005). Las algas epífitas se benefician con los compuestos orgánicos y nutrientes secretados por las macrófitas (Burkholder y Wetzel 1990, Wetzel 2001). Sin embargo, las macrófitas pueden competir por la luz y los nutrientes o pueden liberar sustancias alelopáticas para promover la disminución del crecimiento perifítico (Fitzgerald 1969, Gross *et al.* 2003). Y por último, las macrófitas pueden proveer solamente superficie de colonización para las epífitas sin efectos inhibitorios o estimulantes (Carignan y Kalff 1982, Cattaneo y Kalff 1979). La heterogeneidad de los sustratos junto con los demás aspectos arriba mencionados generan dificultades para la cuantificación de la comunidad. Estos obstáculos tienden a ser disminuidos con el uso de sustratos artificiales para la colonización y el estudio general del perifiton (Albay y Akcaalan 2003, Danilov y Ekelund 2001, Lane *et al.* 2003, McNair y Chow-Fraser 2003, Pizarro *et al.* 2002), sacrificando razonablemente realismo por replicabilidad (Goldsborough *et al.* 2005). Los materiales más utilizados como sustratos artificiales son vidrio, cerámica, acetato,

madera, plástico, etc. Se los emplea comúnmente en estudios manipulativos (Cattaneo y Kalff 1986, Kiffney *et al.* 2003, Sánchez *et al.* 2010), de monitoreo de la calidad del agua (APHA 2005, Meier *et al.* 1983), impacto de contaminantes ambientales (Klapwijk *et al.* 1983) y comparación de distintos ambientes en tiempo y espacio (Pizarro *et al.* 2002).

El uso de sustratos artificiales permite independizarnos de los posibles efectos de los sustratos naturales y analizar la interacción exclusiva de los organismos adheridos con la columna de agua, facilita el diseño de experiencias de colonización y sucesión de la comunidad, además facilita su cuantificación con el consiguiente beneficio en los análisis numéricos y estadísticos posteriores, entre otras ventajas. En estudios ecotoxicológicos de análisis de las características de la columna de agua, resulta ideal la comunidad perifítica desarrollada sobre sustratos artificiales ya que será el reflejo único de las propiedades del medio circundante.

Dentro de las comunidades acuáticas, el perifiton constituye una comunidad ideal para su análisis en función de procesos contaminantes. Esta comunidad resume las condiciones ambientales de un sitio determinado, lo que la hace muy útil para la evaluación de la calidad del agua (APHA 2005). La fracción algal de la comunidad por su parte, es muy apropiada para realizar monitoreos del efecto de contaminantes en cuerpos de agua dulce ya que juega un papel fundamental en los procesos físicos, químicos y biológicos del cuerpo de agua, pues son productores primarios y uno de los componentes base de la trama trófica del sistema (Goldsborough y Robinson 1996). Estos organismos son los primeros en responder y en recuperarse del estrés ambiental (Leclercq y Maquet 1987 en Lowe y Pan 1996, Steinman y McIntire 1990, Stewart *et al.* 1985). Las algas del perifiton poseen atributos que las convierten en organismos propicios para estudios del impacto de contaminantes (Lowe y Pan 1996):

- ⊕ por ser principalmente autótrofas ocupan la base de las tramas tróficas.
- ⊕ al tener hábito sésil no pueden evadir la polución y responden a la “historia” del sitio.
- ⊕ sus cortos ciclos de vida les permiten una rápida respuesta frente al impacto de sustancias contaminantes.
- ⊕ las comunidades son espacialmente compactas, y pueden obtenerse muestras representativas a partir de unos pocos centímetros de sustrato.
- ⊕ pueden ser muestreadas rápidamente y se simplifica el diseño experimental cuando se las estudia sobre sustratos artificiales.

IMPACTO DEL GLIFOSATO EN ORGANISMOS ACUÁTICOS NO BLANCO

La exposición del ambiente al glifosato es extensiva ya que este herbicida se utiliza anualmente en grandes cantidades en todo el mundo. A pesar de su uso tan generalizado y de suponer que su utilización es beneficiosa debido a su baja toxicidad, son muy pocos los estudios sobre su impacto en el ambiente acuático en comparación con otros herbicidas. De todas formas, en los últimos años, ha aumentado el número de investigaciones que tienden a generar información sobre la comprensión del impacto de este herbicida en los sistemas acuáticos.

Se han registrado efectos, tanto del glifosato como de los diferentes formulados y las sustancias aditivas que lo acompañan, en diferentes especies de peces (Kelly *et al.* 2010, Langiano y Martinez 2008, Neškovic *et al.* 1996, Sayuri Shiogiri *et al.* 2010, Wang *et al.* 1994), especialmente salmónidos (Antón *et al.* 1994, Folmar 1978, Folmar *et al.* 1979, Hildebrand *et al.* 1982, Mitchell *et al.* 1987, Morgan y Kiceniuk 1992, Peterson y Hulting 2004, Servizi *et al.* 1987, Tierney *et al.* 2007, Wan *et al.* 1989, 1991). Los anfibios es otro grupo que ha recibido especial atención en relación a los efectos que puede ocasionarle este pesticida, tanto en larvas como en individuos adultos (Cauble y Wagner 2005, Mann *et al.* 2009, Relyea 2004, 2005a, b, c, 2009, Relyea y Jones 2009, Relyea *et al.* 2005, Smith 2001, Solomon *et al.* 2007, Thompson *et al.* 2004).

Sin embargo, es escasa la información sobre estudios realizados en otras poblaciones y/o comunidades acuáticas, en especial las dominadas por invertebrados y plantas. Se han realizado ensayos de toxicidad en laboratorio sobre distintas especies de invertebrados acuáticos (Dutra *et al.* 2011, Henry *et al.* 1994), las más utilizadas pertenecen a los géneros *Daphnia* (Folmar *et al.* 1979, Hartman y Martin 1984, 1985, Hildebrand *et al.* 1980, Peterson y Hulting 2004, Servizi *et al.* 1987) y *Ceriodaphnia* (Tsui y Chu 2003, 2004, Tsui *et al.* 2005), pero son escasos los estudios en la naturaleza (Kreutzweiser *et al.* 1989). Existen también algunos experimentos sobre el impacto del glifosato en invertebrados acuáticos llevados a cabo en mesocosmos (Relyea 2005a, 2009, Relyea *et al.* 2005). Pocos autores han analizado los efectos sobre distintas especies de macrófitas acuáticas (Hartman y Martin 1985, Nielsen y Dahllöf 2007), y lo han realizado principalmente sobre especies del género *Lemna* (Hartman y Martin 1984, 1985, Lockhart *et al.* 1989, Peterson y Hulting 2004, Peterson *et al.* 1994).

La tolerancia de las cianobacterias al glifosato ha sido principalmente estudiada en bioensayos de laboratorio sobre cultivos monoespecíficos (Forlani *et al.* 2008, Maule y Wright 1984, Peterson *et al.* 1994, Powell *et al.* 1991). Bonnet *et al.* (2007) y Tsui y Chu (2003) estudiaron la toxicidad del herbicida sobre la bacteria *Vibrio fischeri*,

en tanto que Amorós *et al.* (2007) lo hicieron sobre *Aeromonas* spp. y *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas de una muestra de agua natural.

Los bioensayos de toxicidad del glifosato con cultivos monoalgales han utilizado principalmente especies de algas verdes dulceacuícolas. Algunas especies utilizadas incluyen: *Chlamydomonas eugametos* (Hess 1980), *Raphidocelis subcapitata* (Ma *et al.* 2006), *Selenastrum capricornutum* (Bozeman *et al.* 1989, Peterson y Hulting 2004, Peterson *et al.* 1994, Tsui y Chu 2003), distintas especies del género *Scenedesmus*, *S. quadricauda* (Ma *et al.* 2003, Peterson *et al.* 1994, Wong 2000) y *S. obliquus* (Ma 2002) y varias especies de *Chlorella*, *C. sorokiniana* (Christy *et al.* 1981), *C. pyrenoidosa* (Ma 2002, Ma *et al.* 2001), *C. fusca* (Faust *et al.* 1994) y *C. vulgaris* (Lipok *et al.* 2010, Ma *et al.* 2002). Maule y Wright (1984) y Vendrell *et al.* (2009) estudiaron los efectos del glifosato sobre el crecimiento poblacional de varias especies de algas verdes, en tanto que Gardner *et al.* (1997) utilizaron el formulado Rodeo[®] para analizar el impacto sobre la densidad de células de *Ankistrodesmus*, y Blanck *et al.* (1984) testearon el efecto de 19 compuestos químicos, incluido el glifosato, sobre 13 especies de algas de agua dulce. También se han utilizado cultivos monoespecíficos de algas perifíticas para estudiar el efecto del glifosato o sus formulados (Blanck *et al.* 1984, Maule y Wright 1984, Peterson *et al.* 1994).

Teniendo en cuenta la gran cantidad de glifosato que se utiliza en la Argentina por año, las investigaciones sobre el efecto de este herbicida en especies dulceacuícolas son muy escasas y se limitan principalmente a bioensayos de toxicidad. Los estudios de laboratorio incluyen el análisis de efectos sobre el pejerrey (Carrquiriborde y Ronco 2006), anfibios (Lajmanovich *et al.* 2003, 2011, Paganelli *et al.* 2010), cladóceros (Alberdi *et al.* 1996), macrófitas (Sobrero *et al.* 2007a) y distintas especies de algas verdes (Asselborn 2003, Asselborn y Zalocar de Domitrovic 1998, Sáenz y Di Marzio 2009, Sáenz *et al.* 1997). Por otro lado, también se han realizado estudios de exposición a formulados de glifosato en condiciones de laboratorio y campo sobre poblaciones experimentales de macrófitas (Martin *et al.* 2003, Sobrero *et al.* 2007b), anfibios (Brodeur 2010, Natale y Ronco 2003) y peces (Carrquiriborde 2010).

A pesar de la importancia de las comunidades fitoplanctónica y perifítica en la base de las tramas tróficas acuáticas, pocos estudios han investigado los efectos del glifosato en las comunidades microbianas de agua dulce (Pechlaner 2002). Chan y Leung (1986) estudiaron el efecto del glifosato sobre el crecimiento, la respiración y la actividad enzimática de bacterias acuáticas en mesocosmos. Schaffer y Sebetich (2004) han estudiado los efectos del formulado Rodeo[®] sobre la producción primaria de fitoplancton natural en el laboratorio, aunque existen también trabajos sobre el

impacto del glifosato sobre comunidades fitoplanctónicas en mesocosmos (Abdel-Hamid *et al.* 1996, Källqvist *et al.* 1994, Relyea 2009, Relyea *et al.* 2005). Algunos autores han utilizado microcosmos para estudiar el efecto del glifosato sobre comunidades microbianas naturales, tanto marinas (Stachowski-Haberkorn *et al.* 2008) como de agua dulce (Pesce *et al.* 2009).

Para la comunidad perifítica pueden encontrarse en la bibliografía ensayos llevados a cabo tanto en cuerpos lénticos (mesocosmos, Goldsborough y Brown 1988, Relyea 2005a, 2009, Relyea *et al.* 2005) como lóticos (Austin *et al.* 1991, Holtby y Baillie 1989, Kish 2006) y en estuarios (Simenstad *et al.* 1996). Sullivan *et al.* (1981) estudiaron los efectos del Roundup[®] sobre diatomeas perifíticas luego de una adición directa del formulado sobre arroyos y un estanque natural.

En Argentina, con excepción de un estudio enfocado en el microzooplancton (José de Paggi y Devercelli 2010), no existen publicaciones que analicen los impactos a nivel comunidad y ecosistema. No se registran en Argentina estudios sobre el efecto del glifosato o sus formulados sobre la comunidad perifítica. En esta tesis profundizaremos sobre los impactos que sufre y los mecanismos por los que esta comunidad responde a la adición del herbicida y los condicionantes ecológicos que generan las diferentes respuestas.

En el **Capítulo 1** de la presente tesis se estudiaron los efectos del formulado de glifosato Roundup[®] en el perifiton de agua dulce, en su interacción con el fitoplancton y un gran número de parámetros físico-químicos, a través de un experimento factorial en mesocosmos al aire libre que simulaban cuerpos de agua someros y permanentes con características limnológicas similares entre sí. Los resultados obtenidos de este experimento han sido incluidos en el trabajo de Pérez *et al.* (2007) (ver Anexo).

En el **Capítulo 2** se describió un acontecimiento observado en los mesocosmos experimentales utilizados en el ensayo del Capítulo 1, adjudicado a un efecto a largo plazo del glifosato y reportado en Vera *et al.* (2010) (ver Anexo).

En el **Capítulo 3** se analizó el efecto del Roundup[®] sobre la colonización y sucesión sobre sustratos artificiales de la comunidad perifítica utilizando mesocosmos experimentales al aire libre que simulaban cuerpos someros de agua dulce con diferentes propiedades limnológicas, algunos con aguas “claras” con macrófitas y/o metafiton y otros con aguas “turbias” con una presencia importante de fitoplancton o materia inorgánica en suspensión. Los resultados obtenidos en este estudio han sido reportados en el manuscrito de Vera *et al.* (2010) (ver Anexo).

En el **Capítulo 4** se analizaron los efectos de un formulado comercial, el Glifosato Atanor[®], sobre el perifiton en interacción con otras comunidades microbianas de agua dulce, fitoplancton, bacterioplancton y zooplancton, y en relación con el medio abiótico, a través de un ensayo manipulativo en microcosmos al aire libre, simulando cuerpos de agua temporarios de pequeño tamaño.

En el **Capítulo 5** se evaluaron los posibles efectos diferenciales entre el formulado Glifosato Atanor[®] y el de su principio activo, glifosato, sobre la comunidad perifítica de agua dulce desarrollada sobre sustratos artificiales en microcosmos en condiciones de laboratorio.

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis es analizar el efecto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre la comunidad del perifiton de ambientes acuáticos de agua dulce desde un punto de vista integrado y ecológico. Se realizará una aproximación a escala comunidad mediante el análisis de la estructura del perifiton natural en microcosmos en condiciones controladas de laboratorio con adición de glifosato o formulados. También se realizarán aproximaciones a nivel ecosistema a través de estudios en mesocosmos y microcosmos al aire libre en los que se analizará el perifiton en interacción con otras comunidades microbianas (fitoplancton, bacterioplancton y zooplancton) y con el medio abiótico en escenarios con y sin formulados de glifosato.

CAPÍTULO 1

EFFECTOS DEL ROUNDUP® SOBRE COMUNIDADES MICROBIANAS DE AGUA DULCE: ESTUDIO EN MESOCOSMOS

INTRODUCCIÓN

La estructura de las comunidades naturales, la riqueza y diversidad de especies y las interacciones entre ellas tienen profundas implicancias en el funcionamiento de los ecosistemas, modulando los flujos de energía y materiales dentro y entre los ambientes (Pratt *et al.* 1997). Las actividades humanas, directa o indirectamente, incorporan factores de estrés a los ecosistemas acuáticos naturales (como ser, el cambio climático, la eutrofización, la contaminación química), que tienen el potencial de afectar la estructura y funcionamiento de las comunidades naturales. Entre estos factores de estrés, se ha reportado que los herbicidas causan cambios dramáticos en los ambientes dulceacuícolas (*e.g.*, Gustavson *et al.* 2003, Relyea 2005a, b, Rohr y Crumrine 2005).

Dado nuestro incipiente y fragmentado entendimiento de los efectos que los pesticidas tienen en las comunidades naturales (Pratt *et al.* 1997, Rohr y Crumrine 2005), nuestra habilidad para pronosticar de manera precisa las consecuencias de su uso, es bastante limitada. Ésto se ve agravado en los ecosistemas de agua dulce ya que muchos pesticidas se acumulan y concentran en los cuerpos de agua (Streit 1992). Desde mediados de los '90, la producción global de cultivos genéticamente modificados con tolerancia a herbicidas ha aumentado permanentemente (James 2009). Desafortunadamente, los estudios para predecir los impactos futuros de esta nueva tecnología no han seguido el mismo ritmo de incremento que la tremenda expansión que han tenido los cultivos biotecnológicos.

Dado el importante incremento en el uso del glifosato que ha sufrido la Argentina, también aumenta la probabilidad del transporte del glifosato a los ecosistemas acuáticos cercanos a los campos de cultivo. Una vez en el ambiente acuático, el glifosato puede ser tóxico para la biota acuática natural, sin embargo, pocos estudios han sido realizados para ensayar sus efectos sobre ésta (Austin *et al.* 1991, Pechlaner 2002).

Las algas del perifiton poseen varios atributos que las hacen organismos ideales para utilizar en la evaluación de la calidad del agua (ver página 20 de la Introducción general). Para estudiar la respuesta del perifiton a una perturbación, se pueden analizar sus aspectos estructurales o funcionales. Dentro de los estructurales, además de la composición taxonómica y diversidad específica, pueden evaluarse las distintas fracciones de su masa (autótrofa, heterótrofa e inorgánica) permitiendo inferir aspectos funcionales de la comunidad (Pizarro y Alemanni 2005). Existen varios ejemplos de ensayos en sustratos artificiales en los que se determinan los cambios y las diferencias en la composición de especies (Sládečková 1990), o cambios en la biomasa (Cosgrove *et al.* 2004, Pizarro y Alemanni 2005) para monitorear la calidad

del agua. Dentro de las variables de masa que se utilizan para estudiar la comunidad perifítica encontramos el peso seco (PS) que integra las fracciones orgánica e inorgánica, el peso seco libre de cenizas (PSLC) que nos permite estimar el componente orgánico y la fracción inorgánica del perifiton está dada por las cenizas. Por otro lado, la concentración de clorofila *a* perifítica estima la fracción autótrofa de la comunidad (APHA 2005, Lowe y Pan 1996). Otra variable perifítica que se utiliza es el índice autotrófico (IA, Weber 1973). El IA, que se estima como el cociente entre el PSLC y la concentración de clorofila *a* perifítica, indica si la composición de la comunidad es autotrófica o heterotrófica. Si existe mucha materia orgánica en el medio puede ocurrir un incremento en la deposición de material particulado orgánico de la columna de agua en la matriz perifítica llevando al aumento de la biomasa bacteriana o fúngica del perifiton y por lo tanto mayor será el valor del IA (Lowe y Pan 1996). Valores del IA se encuentran entre 50 y 200 corresponden a una comunidad en donde los procesos de respiración y producción se encuentran balanceados. En tanto que valores mayores indican una alta proporción de organismos heterotróficos, no clorofílicos y detritus orgánico (APHA 2005) lo que se puede corresponder a una mala calidad del agua.

Existen algunos estudios que se han enfocado en los efectos del Roundup® sobre las características estructurales de la comunidad perifítica en sistemas lóticos. Holtby y Baillie (1989) utilizan para este propósito las variables de masa (PS, PSLC y clorofila *a* perifítica) y la composición de especies, mientras que Kish (2006) analiza los efectos del Roundup® sobre la estructura de la comunidad midiendo los cambios en la composición de la clorofila total. Austin *et al.* (1991) utilizan otro formulado basado en glifosato, Vision®, con propósitos similares en un sistema lótico experimental, analizando modificaciones en la composición de especies algales y en la acumulación de biomasa del perifiton, estimada con el PSLC. En cambio, Relyea (2005a) estudia el impacto del Roundup® sobre el PS del perifiton utilizando mesocosmos.

El estudio factorial realizado en mesocosmos experimentales al aire libre que se presenta en este capítulo tuvo como **objetivo general** identificar los potenciales efectos del formulado de glifosato Roundup® en el perifiton de agua dulce desarrollado sobre sustratos artificiales en interacción con el fitoplancton y un gran número de parámetros físico-químicos, simulando cuerpos de agua someros y permanentes. Los resultados obtenidos han sido reportados en el trabajo de Pérez *et al.* (2007).

Los **objetivos específicos** planteados son los siguientes:

(1) Estudios taxonómicos y cuantitativos de la fracción autótrofa de la comunidad perifítica.

- (2) Análisis de las distintas fracciones de masa perifítica por evaluación de peso seco, cenizas, peso seco libre de cenizas y concentración de clorofila *a*.
- (3) Análisis cuali y cuantitativo del micro- y nanofitoplancton (fracción >2 μm) y análisis cuantitativo de la comunidad picoplanctónica, autotrófica y heterotrófica.
- (4) Estimación de la producción primaria fitoplanctónica (fracción >2 μm).
- (5) Estudio de las variables físico-químicas del agua de los mesocosmos mediante la medición *in situ* y análisis en laboratorio.

Hipótesis

Las algas, por poseer la ruta metabólica del ácido shikímico, se verán afectadas por la acción toxicológica del glifosato. Por lo tanto, se espera que en presencia del herbicida en el agua exista:

H1: una disminución de la densidad de la fracción algal perifítica y del fitoplancton.

H2: una mayor mortalidad algal cuanto mayor sea la concentración del ingrediente activo en el agua de los mesocosmos tratados.

H3: un decrecimiento de la biomasa perifítica.

H4: una disminución de la producción primaria fitoplanctónica.

Las cianobacterias son organismos capaces de soportar ambientes extremos, incluyendo los ambientes con herbicidas, por lo tanto, esperamos:

H5: un aumento de la densidad de las cianobacterias, perifíticas y planctónicas, en los mesocosmos con agregado de Roundup®.

Ya que las bacterias son los principales microorganismos que degradan la molécula de glifosato, se estima:

H6: un aumento de la densidad del bacterioplancton en los mesocosmos tratados, siendo mayor el aumento a mayor dosis del herbicida.

Hipotetizamos que la adición de glifosato, que contiene fósforo en su molécula, generará:

H7: un aumento del fósforo total en el agua de los mesocosmos tratados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción y preparación de las unidades experimentales

Las unidades experimentales consistieron en piletas de aproximadamente 1,2 metros de profundidad y 25 m² de superficie (~30.000 litros) ubicados en el predio del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), CONICET (Chascomús, provincia de Buenos Aires) (Fig. 1.1). Se construyeron 10 piletas al aire libre (mesocosmos) con el objeto de simular cuerpos de agua someros para llevar a cabo una serie de experimentos manipulativos a campo. Para la construcción de estos mesocosmos se realizó una acumulación y nivelación de tierra para levantar una lomada en la cual se realizaron cada una de las excavaciones correspondientes a los 10 mesocosmos. Cada excavación (cava) fue tapizada con nylon negro para el aislamiento y prevención del escurrimiento hacia el suelo aledaño. La base de cada mesocosmos fue cubierta con tierra del lugar para proporcionarle sedimentos a cada ambiente. Por último, las 10 excavaciones se llenaron con agua de red del lugar en diciembre de 2004 y se las dejó evolucionar hasta el comienzo de la experiencia en marzo de 2005.

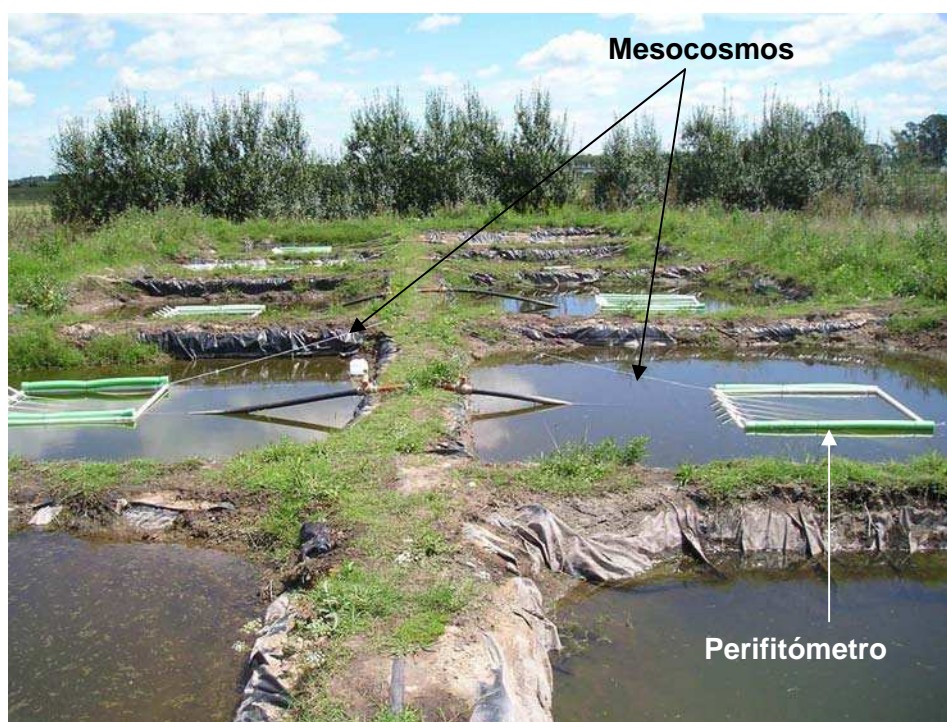


Fig. 1.1. Mesocosmos construidos en el IIB-INTECH – CONICET (Chascomús). Se observa la estructura de sostén (perifitómetro) para el perifiton (se explica más adelante).

Diseño experimental

Entre el 10 y el 21 de marzo del año 2005, se llevó a cabo un experimento factorial en los 10 mesocosmos antes mencionados. Se ensayaron tres concentraciones del herbicida Roundup®: un *control* (sin adición del pesticida, con cuatro réplicas), una *dosis baja* (concentración nominal de glifosato 6 mg de ingrediente activo (i.a.)/litro, con tres réplicas), y una *dosis alta* (concentración nominal de glifosato 12 mg de i.a./litro, con tres réplicas). La asignación de los tratamientos en los mesocosmos se realizó al azar, el volumen de formulado se roció en la superficie de cada mesocosmos y luego se homogeneizó utilizando un remo. Estas concentraciones fueron elegidas para ser comparables con concentraciones ensayadas por otros autores (Goldsborough y Brown 1988, Kish 2006, Schaffer y Sebetich 2004). Las concentraciones elegidas estuvieron un poco por sobre las máximas medidas (Berkovic *et al.* 2006, Edwards *et al.* 1980) o estimadas a encontrarse (Mann y Bidwell 1999) en ambientes naturales. Por lo tanto, representan los peores escenarios posibles de concentraciones que podemos encontrar en la naturaleza, lo que constituye, como ya fue enfatizado en la Introducción general, el primer paso en una evaluación de riesgos de contaminantes (Giesy *et al.* 2000).

Se colectaron muestras de agua de cada mesocosmos en cuatro ocasiones usando una botella tipo Van Dorn. Las primeras muestras fueron colectadas inmediatamente antes de la aplicación (para la mayoría de las variables) o inmediatamente después de la aplicación (para la determinación de glifosato). El resto de las muestras fueron colectadas a los 1, 6 y 11 días después de la aplicación del herbicida. Las muestras se colocaron en bidones plásticos de 5 litros que fueron llevados al laboratorio. Allí se tomaron las submuestras para las determinaciones de glifosato y los análisis de las variables físicas, químicas y biológicas.

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con investigadores y personal técnico del Laboratorio de Fotobiología del IIB-INTECH, CONICET (Chascomús), del ILPLA (Instituto de Limnología de La Plata “Dr. Raúl A. Ringuelet”) y del Laboratorio de Limnología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Variables biológicas

Comunidad perifítica

Para el estudio de todas las variables de la comunidad perifítica se utilizaron sustratos artificiales los que consistieron en rectángulos de policarbonato transparente de aproximadamente 12 cm de largo por 6 cm de ancho y 1 mm de espesor. Los

sustratos artificiales fueron sostenidos de una estructura de PVC (perifitómetro), la cual estaba asociada a un sistema de flotación (Fig. 1.1 y 1.2) sujetado por sogas a la orilla del mesocosmos. Los sustratos en el perifitómetro se encontraban ubicados a 10 cm aproximadamente por debajo de la superficie del agua del mesocosmos. Los perifitómetros con los sustratos fueron colocados a incubar en cada mesocosmos 25 días antes del comienzo del experimento para alcanzar un valor máximo de biomasa perifítica.

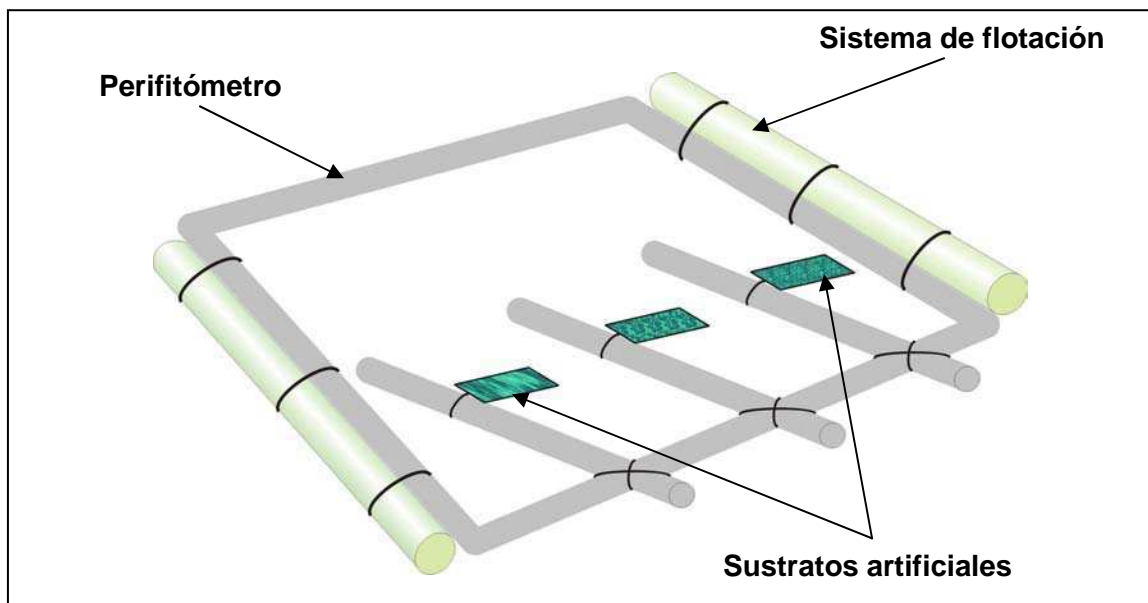


Fig. 1.2. Esquema de la estructura de sostén de PVC (perifitómetro), con los sustratos artificiales, asociada al sistema de flotación.

En cada fecha de muestreo se extrajo de cada uno de los mesocosmos una cantidad determinada de sustratos colonizados que fueron llevados en oscuridad al laboratorio para su posterior procesamiento. El perifiton desarrollado en los sustratos fue removido raspando la superficie de los mismos y llevado a un volumen conocido con agua destilada, este volumen fue dividido en alícuotas para los diferentes análisis. Todas las variables perifíticas se expresaron por unidad de área (APHA 2005).

Las muestras para análisis cualitativo se fijaron con formaldehído al 2%. En el laboratorio se procedió a la identificación taxonómica de los componentes algales de la comunidad perifítica bajo microscopio óptico equipado con cámara clara. Para la identificación específica de las Bacillariophyta (diatomeas) se realizaron preparados permanentes. Para ello, el material fue oxidado en caliente con peróxido de hidrógeno al 30% y luego lavado con agua destilada (Battarbee 1986). Los preparados permanentes se confeccionaron utilizando NAPHRAX[®] como medio de montaje. Se

consideraron como individuos muertos aquéllos que presentaban el cloroplasto desorganizado al microscopio y/o a las diatomeas con los frústulos rotos o separados. Para la determinación taxonómica se empleó la siguiente bibliografía: para géneros Bourrelly (1970, 1972 y 1981); para Cyanobacteria se utilizó Anagnostidis y Komárek (1988), Desikachary (1959), Geitler (1932) y Komárek y Anagnostidis (1999) y para Bacillariophyta se utilizó Hustedt (1930, 1942), Krammer y Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991a, b) y Patrick y Reimer (1966, 1975).

Las muestras destinadas a los análisis cuantitativos se fijaron con lugol acético a una concentración final del 1%. Los recuentos se realizaron en microscopio invertido siguiendo la metodología descrita por Utermöhl (1958). El error de los recuentos se estimó según Venrick (1978), aceptando un error máximo del 15%.

La concentración de clorofila *a* de la fracción algal del perifiton fue estimada a partir de muestras que fueron obtenidas por filtrado del material raspado a través de filtros Whatman® GF/F. Los filtros fueron inmediatamente envueltos en papel aluminio y almacenados a -80°C hasta su procesamiento (dentro de los 2 meses de realizado el muestreo). Los pigmentos fueron extraídos durante toda la noche a 4°C, en una atmósfera saturada con nitrógeno, utilizando acetona líquida 90% en volumen, y los extractos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Los extractos de los pigmentos fueron medidos por HPLC de fase reversa y apareamiento iónico (modificado de Hurley [1988] y Mantoura y Llewellyn [1983]) usando un cromatógrafo Äktabasic (Amersham, Buckinghamshire, UK) controlado por el programa Unicorn (Amersham, Buckinghamshire, UK). El método empleado fue descrito en Laurion *et al.* (2002). El sistema HPLC fue calibrado con estándares primarios disponibles comercialmente que fueron provistos por la International Agency for ¹⁴C Determination o por Sigma (Buchs, Switzerland). La estimación de la concentración de clorofila *a* fue llevada a cabo por el Dr. Pérez en el INTECH.

Se estimaron las distintas fracciones de masa del perifiton: peso seco (PS), cenizas (C) y peso seco libre de cenizas (PSLC). Para realizar esto se calcinaron previamente en la mufla (440°C) filtros Whatman® GF/C durante 2 horas para luego pesarlos (peso del filtro). Se filtraron las muestras a través de estos filtros calcinados, los que fueron secados en estufa (60-70°C), y luego pesados. Por diferencia entre este peso y el peso del filtro se obtuvo el PS. Estos filtros secados se calcinaron en mufla (440°C, 2 horas), y luego se pesaron. Las cenizas se obtuvieron por diferencia entre este peso y el peso del filtro. El PSLC se obtuvo a partir de la diferencia entre el PS y las C (APHA 2005). También se estimó el índice autotrófico (IA) como la relación entre el PSLC y la concentración de clorofila *a* perifítica (APHA 2005, Lowe y Pan 1996). El

tratamiento de las muestras del perifiton se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Rodríguez en el Laboratorio de Limnología de la FCEyN, UBA.

Análisis cuantitativo del plancton

Las muestras para el cálculo de la abundancia del plancton se tomaron directamente de los mesocosmos en frascos de PVC. Se cuantificaron las diferentes fracciones de tamaño del fitoplancton y el bacterioplancton.

Las muestras del micro- (>20 μm) y nanofitoplancton (2–20 μm) fueron fijadas con lugol acético a una concentración final del 1%. Los recuentos de estas fracciones fueron realizados utilizando la técnica de microscopio invertido (Utermöhl 1958) a 400X. El error (<15%) fue estimado de acuerdo a Venrick (1978).

Las muestras de picofitoplancton (0,2–2 μm) y bacterioplancton fueron preservadas con glutaraldehído frío al 2%. Para el recuento de la fracción picoplanctónica se aprovechó la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos (Caron 1983, Hawley y Whitton 1991). Las muestras fueron colectadas en filtros negros de policarbonato de 0,2 μm (Isopore GTPB 02500; Isopore, Billerica, Massachusetts, USA) y luego montadas en un portaobjetos con una gota de aceite de inmersión (Immersol Zeiss 518 F; Zeiss, Jena, Alemania). Cada filtro fue examinado para autofluorescencia de pigmentos con un microscopio Zeiss Axioplan equipado con una lámpara HBO 50-W y un set de filtros para excitación de luz azul (BP 450–490 nm, FT 510 nm, LP 520 nm) y de luz verde (BP 546 nm, FT 580 nm, LP 590 nm) (Rankin *et al.* 1997, Wynn-Williams 1992). El bacterioplancton fue concentrado y contado en filtros de policarbonato (como los nombrados más arriba), que fueron teñidos con DAPI (Porter y Feig 1980). Las bacterias fueron contadas usando un microscopio de epifluorescencia con excitación de UV (BP 365 nm, FT 395 nm, LP 397 nm). Para las estimaciones de abundancia del picofitoplancton y del bacterioplancton se contaron un mínimo de 20 campos y 400 individuos en cada preparado (error <15%).

El análisis del fitoplancton y el bacterioplancton fue llevado a cabo por las Dras. Izaguirre y Allende y el Lic. do Nascimento en el Laboratorio de Limnología de la FCEyN, UBA.

Producción primaria fitoplanctónica

La producción primaria fitoplanctónica (PP) fue estimada mediante la técnica del ^{14}C (Steeman-Nielsen 1952). Las muestras fueron incubadas por 3 horas al mediodía en tubos de cuarzo de 45 ml que fueron colocados por debajo de la superficie del agua de una pileta exterior. Para cada mesocosmos se incubaron dos muestras a niveles de irradiancia saturante sin fotoinhibición, usando filtros de

densidad neutra en combinación con una placa de policarbonato de 3 mm de espesor que bloquea las longitudes de onda menores a 395 nm, para remover el componente UV de la luz solar. Los niveles de irradiancia se decidieron en función de una curva de producción *versus* irradiancia que se realizó previamente. Además, por mesocosmos se recubrió un tubo con papel aluminio que fue utilizado como un estimador de la asimilación de ^{14}C en oscuridad (control oscuro). Se adicionó a cada tubo 1 μl de NaHCO_3 marcado con ^{14}C . Luego de la incubación las muestras fueron filtradas por filtros de fibra de vidrio tipo Whatman[®] GF/F. Los filtros se colocaron dentro de viales de centelleo (4 ml) en una atmósfera saturada de ácido clorhídrico y luego fueron secados sobre una plancha calefactora en campana durante una noche. Se agregaron a cada vial 2,5 ml de solución de centelleo (OptiPhase 'HiSafe'3, Van Nuys, California, USA) y se midió la actividad de los filtros con un contador de centelleo (Beckman LS 5000TD 10, Fullerton, California, USA). La asimilación de ^{14}C en oscuridad fue sustraída de las estimaciones de PP.

La Dra. Torremorell estuvo a cargo de la estimación de la producción primaria fitoplanctónica en el INTECH.

Variables físico-químicas

Análisis físicos y químicos del agua de los mesocosmos

En todas las fechas de muestreo se midieron *in situ* temperatura, pH (Orion pH-metro), concentración de oxígeno disuelto (YSI 5000 metro) y conductividad (conductímetro Hach[®]).

El agua para los análisis químicos fue filtrada inmediatamente después de tomada la muestra a través de filtros de fibra de vidrio Whatman[®] GF/C. El fósforo reactivo soluble (FRS) se determinó por el método molibdato-ácido ascórbico y el fósforo total (FT) fue medido de la misma manera que el FRS luego de la digestión ácida de las muestras sin filtrar (APHA 2005). El nitrato (N-NO_3^-) se determinó por reducción a nitrito usando una columna de reducción con cadmio y el nitrito (N-NO_2^-) mediante diazotización. El amonio (N-NH_4^+) se midió por el método del indofenol (APHA 2005). El calcio (Ca^{2+}) y el magnesio (Mg^{2+}) fueron determinados por espectrometría de absorción atómica, el sodio (Na^+) y el potasio (K^+) fueron estimados por fotometría de llama, el ión bicarbonato (HCO_3^-) por titulación, el sulfato (SO_4^{2-}) por turbidimetría, y el cloruro (Cl^-) mediante titulación con nitrato de plata (AgNO_3), siguiendo APHA (2005). La concentración de los sólidos totales en suspensión (STS) fue determinada como la diferencia de masa luego del filtrado por filtros Whatman

GF/C previamente calcinados a 550°C por 2 horas. La alcalinidad se determinó mediante titulación con H₂SO₄ 0,1 N (APHA 2005).

Los análisis químicos del agua de los mesocosmos se realizaron en el Instituto Limnológico de La Plata y fueron llevados a cabo por los Dres. Bonetto y Mugni.

Se guardaron alícuotas de agua filtrada a 4°C antes del análisis del carbono orgánico disuelto (COD). El COD fue medido por el método de combustión a alta temperatura (Shimadzu TOC-5000; Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, South Carolina, USA). Antes de las mediciones, las muestras fueron sonicadas y acidificadas con HCl (APHA 2005). Este análisis fue llevado a cabo por el Dr. Morris en la Universidad de Lehigh, USA.

Análisis de la concentración de glifosato

Los análisis de concentración de glifosato en el agua se realizaron a partir de muestras de agua filtradas por filtros de membrana de 0,45 µm. Los análisis se llevaron a cabo por HPLC (*high-performance liquid chromatography*) de fase reversa, previa derivatización de las muestras con cloruro de FMOC (*fluorenylmethyl chloroformate chloride*) siguiendo el protocolo de Miles *et al.* (1986). Estos análisis fueron llevados a cabo en el INTECH por la Dra. Ferraro y el Dr. Pérez.

Análisis estadístico

Antes de cada análisis, se llevaron a cabo las pruebas de Kolmogorov-Smirnov (con corrección de Lilliefors) y de la mediana de Levene, para corroborar normalidad y homocedacia, respectivamente. Cuando los datos no cumplieron con alguno de estos supuestos, los valores fueron transformados (raíz cuadrada, raíz cuadrada del arco seno, o logaritmo) según fuera necesario. Para todas las variables, se analizaron las diferencias entre tratamientos utilizando el análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA MR), con tres tratamientos (control, dosis baja, y dosis alta de glifosato) y cuatro fechas de muestreo (0, 1, 6, y 11 días). Se realizaron análisis de efectos simples cuando la interacción tiempo-tratamiento resultó significativa. Se llevaron a cabo comparaciones múltiples *a posteriori* usando el método de Tukey (Zar 1996).

RESULTADOS

Efecto del Roundup® sobre la comunidad perifítica

A partir del análisis cualitativo de las algas perifíticas en las muestras de todo el experimento se determinaron las especies detalladas en la Tabla 1.1. Para mayor practicidad a lo largo de la tesis se incluirán a las cianobacterias dentro de las algas aunque estrictamente no lo sean.

BACILLARIOPHYTA	CYANOBACTERIA	CHLOROPHYTA
<i>Achnanthydium exigua</i>	<i>Chroococcus</i> spp.	<i>Monoraphidium</i> spp.
<i>Amphora</i> spp.	<i>Cyanothece</i> spp.	<i>Oocystis</i> spp.
<i>Cocconeis</i> sp.		
<i>Cyclotella meneghiniana</i>		
<i>Chaetoceros muelleri</i>		
<i>Gomphonema parvulum</i>		
<i>Navicula</i> spp.		
<i>Navicymbulla pusilla</i>		
<i>Nitzschia</i> spp.		
<i>Stauroneis tackei</i>		

Tabla 1.1. Especies de algas del perifiton halladas en los mesocosmos de los distintos tratamientos a lo largo de la experiencia.

En relación a la densidad total (vivas + muertas) de los distintos grupos algales, la comunidad perifítica estuvo dominada por las Bacillariophyta (diatomeas) durante toda la experiencia en los tres tratamientos, con una densidad total media general de $1,91 \times 10^6 \pm 8,96 \times 10^5$ algas/cm² (media \pm desvío estándar) representando más del 78% en promedio para todo el estudio. En segundo lugar, se encontraron las cianobacterias (media general para la experiencia, $5,71 \times 10^5 \pm 7,31 \times 10^5$ algas/cm²) y por último las Chlorophyta (algas verdes) con menos del 0,15% en promedio para todo el experimento (Fig. 1.3).

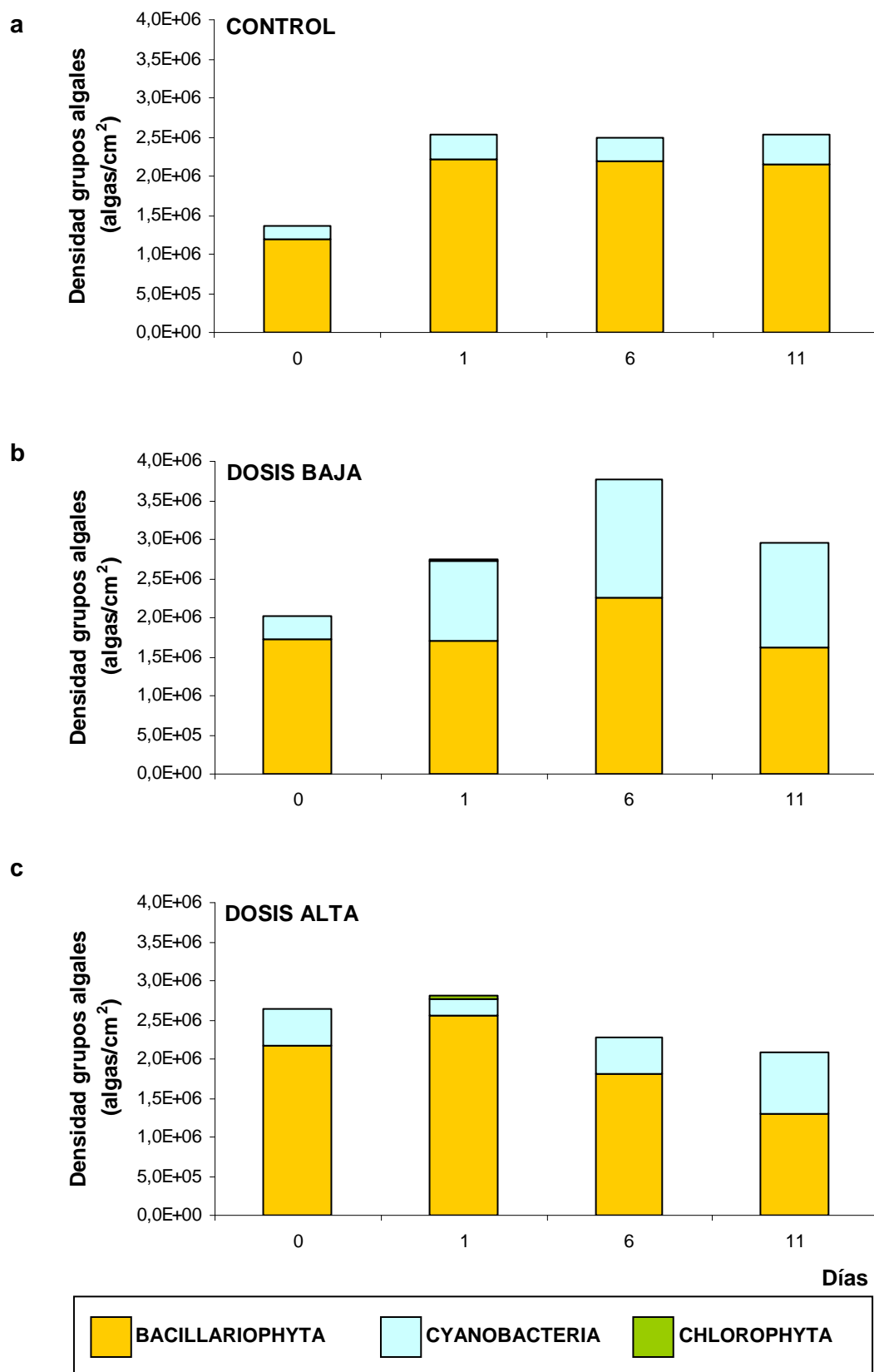


Fig. 1.3. Densidad total (vivas + muertas) promedio de los distintos grupos algales para los mesocosmos (a) control, (b) tratados con baja dosis (6 mg/l) y (c) alta dosis (12 mg/l) de herbicida a lo largo del período de estudio.

La abundancia algal perifítica total durante todo el experimento fluctuó entre $4,85 \times 10^5$ y $5,86 \times 10^6$ individuos/cm². Las abundancias medias iniciales fueron de $1,35 \times 10^6 \pm 3,63 \times 10^5$ ind./cm² (media \pm desvío estándar) para el control, $2,02 \times 10^6 \pm 1,20 \times 10^6$ ind./cm² para la dosis baja y para la dosis alta, $2,64 \times 10^6 \pm 1,35 \times 10^6$ ind./cm². La abundancia algal perifítica total no pudo relacionarse con los tratamientos o los tiempos de muestreo. Debido a la variabilidad inicial entre las réplicas, las diferencias entre los tratamientos pudieron apreciarse mejor al expresar la abundancia del perifiton como porcentaje de los valores iniciales para cada mesocosmos (Fig. 1.4), pero sin registrarse tampoco en este caso diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA MR, $p > 0,05$).

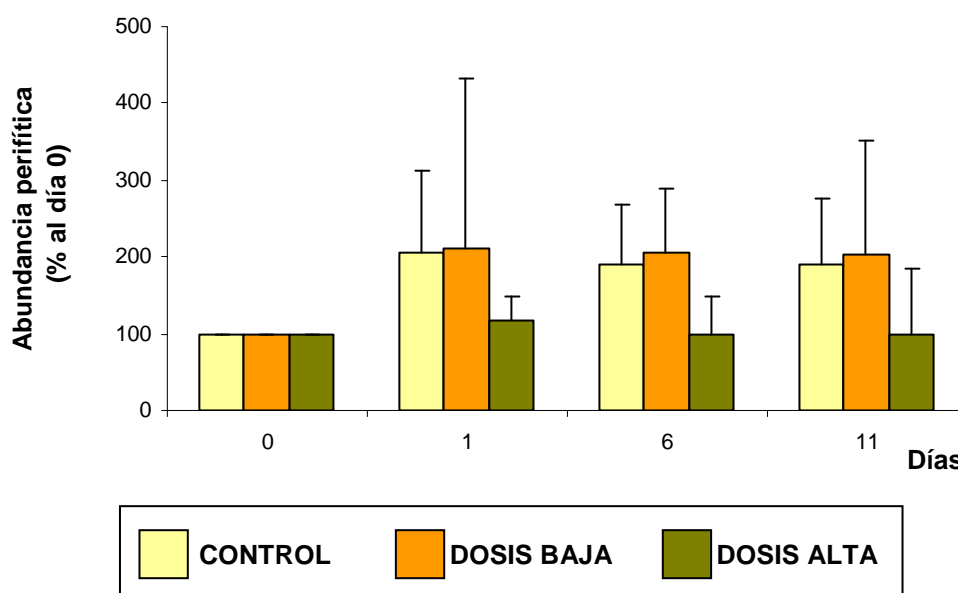
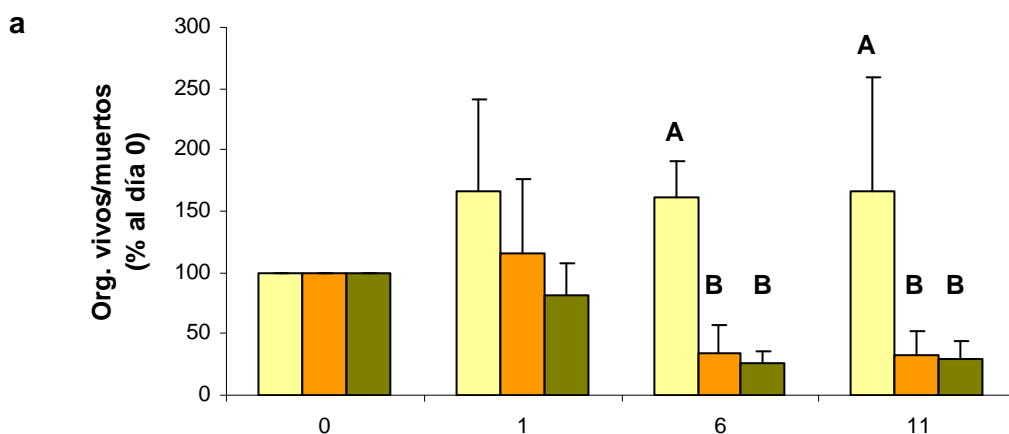


Fig. 1.4. Valores medios de abundancia algal perifítica total como porcentaje de los valores iniciales del día 0 en los distintos tratamientos durante el período de estudio. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

Los rangos de valores iniciales para la proporción de organismos vivos/muertos del perifiton en los mesocosmos control variaron entre 2,68 y 11,08; en los adicionados con una baja dosis de glifosato fluctuaron entre 6,01 y 20,19 y estuvieron entre 12,95 y 16,23 en los mesocosmos con dosis alta de herbicida. Para independizarnos de estas diferencias iniciales entre las réplicas, la proporción de organismos vivos/muertos también fue expresada como porcentaje de los valores al día 0 para cada mesocosmos (Fig. 1.5a). Estandarizando a los valores iniciales, se pudieron observar diferencias entre los tiempos y entre los tratamientos (ANOVA MR, $p < 0,05$). Las comparaciones de medias mostraron que la proporción organismos vivos/muertos

(como porcentaje de los valores iniciales) presentaba diferencias significativas entre los mesocosmos control y los tratados con ambas dosis (ANOVA MR, $p < 0,05$). Hacia el final del experimento, se pudo observar una disminución de alrededor de 3 veces en la proporción de individuos vivos/muertos en los mesocosmos tratados con Roundup® con respecto a los valores iniciales (Fig. 1.5a). A los 6 y 11 días de iniciado el experimento se observó un incremento en el número de frústulos de diatomeas vacíos en los mesocosmos tratados con herbicida (Fig. 1.5b), sin registrarse diferencias significativas entre los tratamientos o los tiempos (ANOVA MR, $p > 0,05$). Debido a este aumento de diatomeas muertas se observa una disminución significativa (ANOVA MR, $p < 0,05$) aún mayor (aproximadamente 5 veces) para la proporción de diatomeas vivas/muertas relativizada al t0 (Fig. 1.5c). No se observaron efectos en la mortalidad del resto de las algas perifíticas, por lo que el patrón de abundancia de diatomeas muertas observado se condice con el patrón de algas totales perifíticas muertas y con la disminución en la proporción de organismos vivos/muertos descrita más arriba.



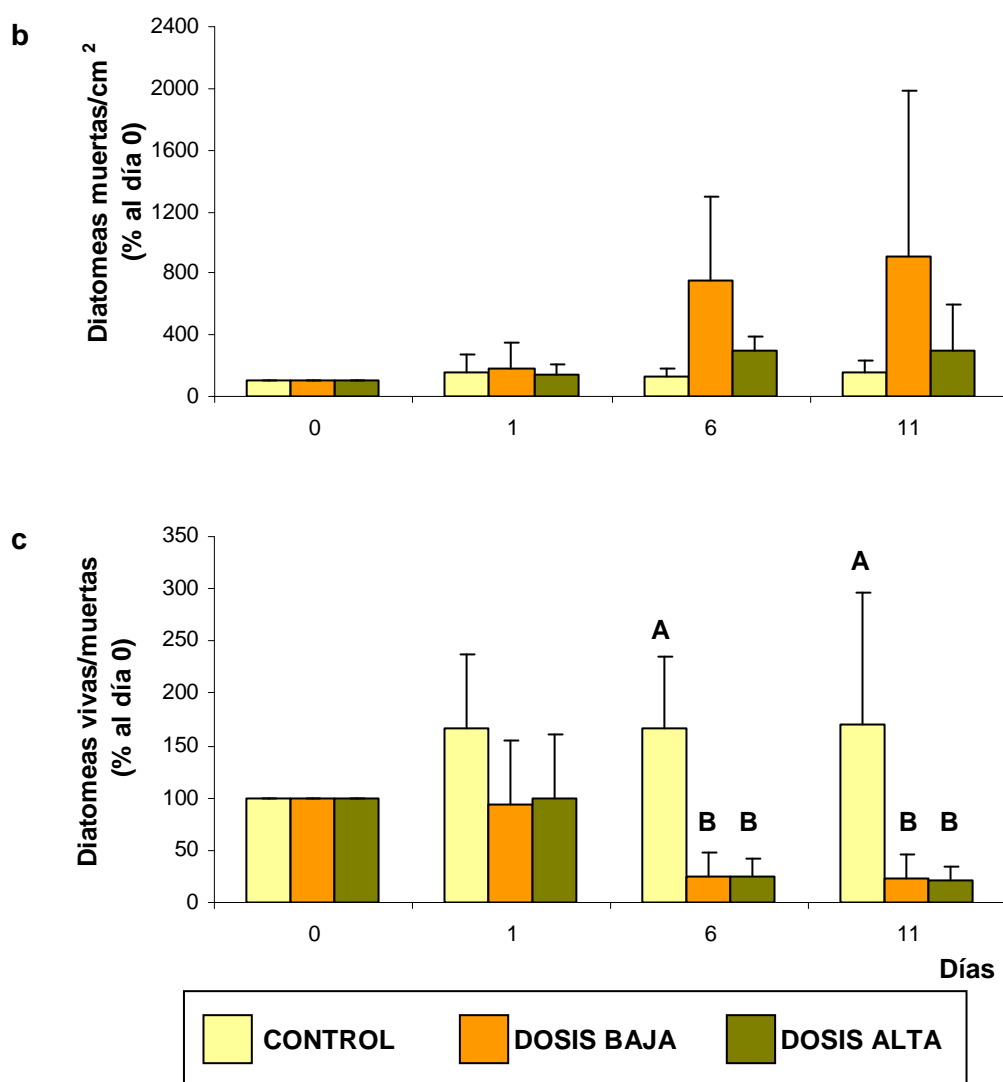


Fig. 1.5. Valores promedio de (a) la proporción de algas vivas/muertas, (b) la abundancia de diatomeas muertas y (c) la proporción de diatomeas vivas/muertas del perifiton como porcentaje de los valores iniciales durante el experimento en los mesocosmos control y con adición de baja (6 mg/l) y alta (12 mg/l) dosis de herbicida. Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) están indicadas con distintas letras. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

Las abundancias promedio de cianobacterias perifíticas al t0 fueron $1,68 \times 10^5 \pm 9,93 \times 10^4$ células/cm² (media \pm DE) para los controles, para el tratamiento con baja dosis de Roundup[®] fueron de $2,91 \times 10^5 \pm 3,95 \times 10^4$ células/cm² y para los mesocosmos con la dosis más alta, $4,62 \times 10^5 \pm 4,33 \times 10^5$ células/cm². La abundancia total de cianobacterias del perifiton se estandarizó a los valores iniciales, pero las diferencias entre los tratamientos no fueron estadísticamente significativas (ANOVA MR, $p > 0,05$). Las cianobacterias perifíticas (en particular *Cyanothece* spp.) parecieron

aumentar hacia el final del experimento en los mesocosmos con adición del herbicida (alrededor de 5 veces los valores iniciales) (Fig. 1.6), tendencia que también fue observada en la fracción picoplanctónica del fitoplancton (ver sección “Efectos sobre el plancton”).

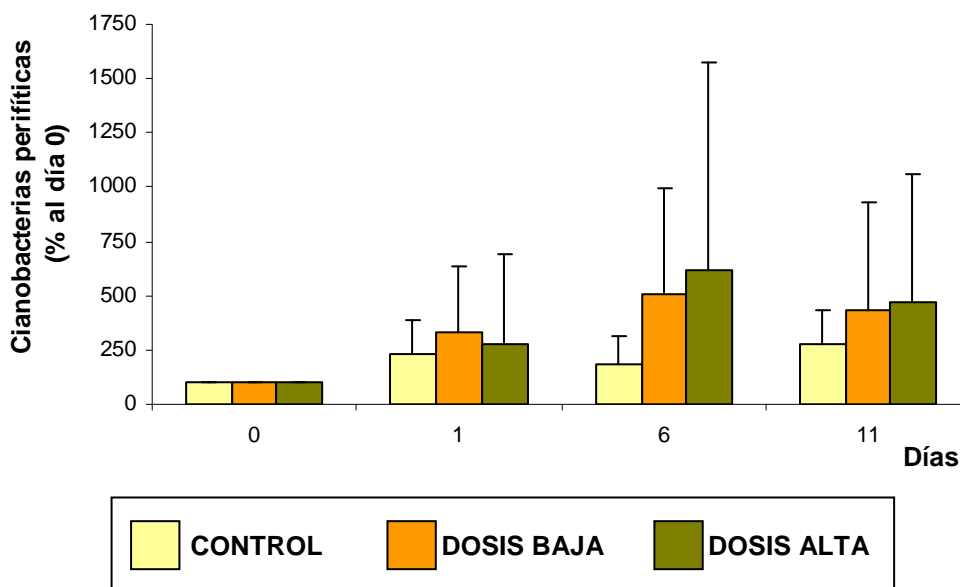
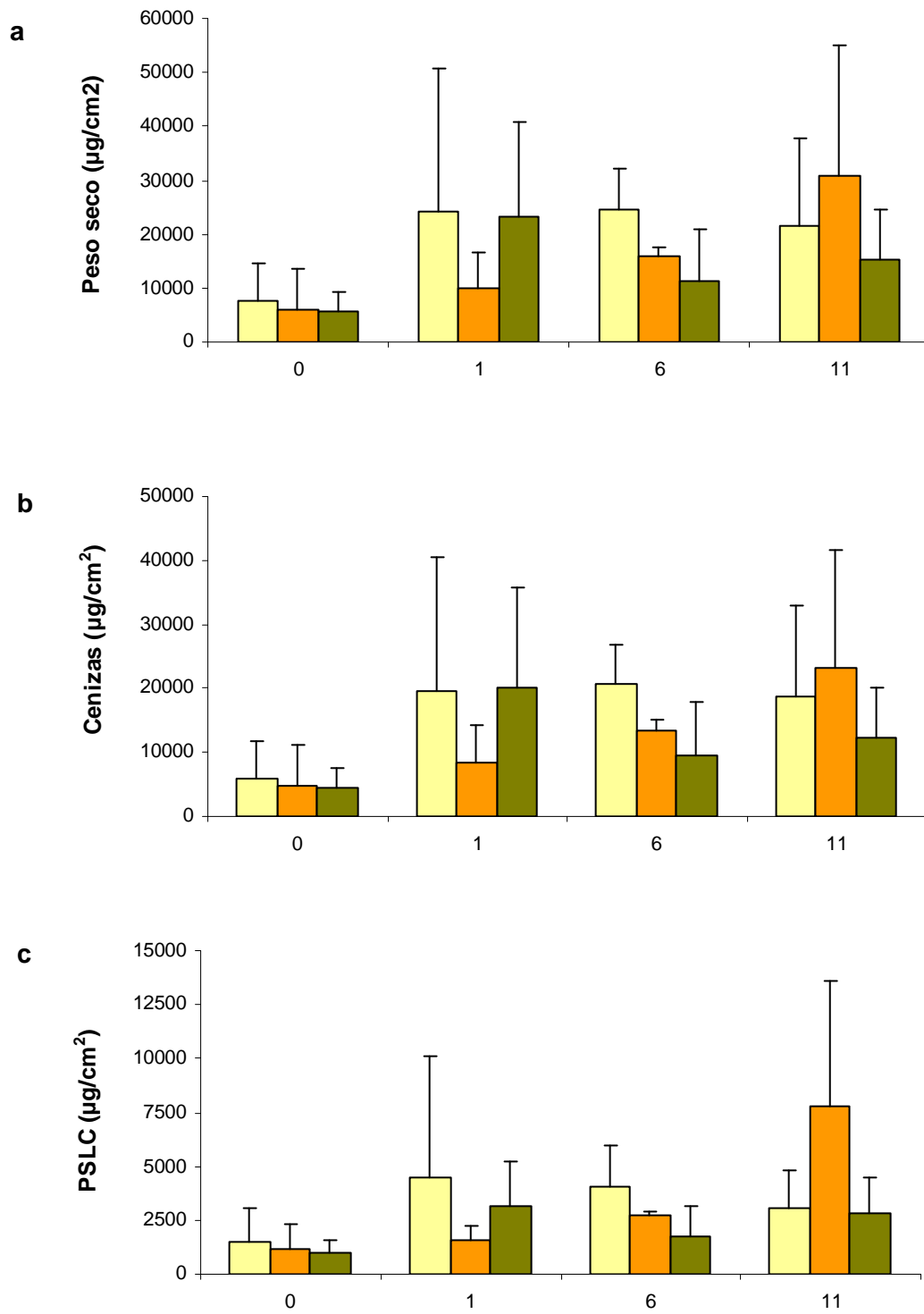


Fig. 1.6. Valores medios de abundancia total de cianobacterias perifíticas como porcentaje de los valores iniciales del día 0 durante el tiempo que duró el estudio en los distintos tratamientos. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

Los valores medios del peso seco fueron de $19433,96 \pm 16346,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (media \pm DE), $15735,19 \pm 14908,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $13838,97 \pm 11691,85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y los de las cenizas, $16157,46 \pm 13462,49 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $12408,86 \pm 11295,72 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $11654,88 \pm 10199,90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para los mesocosmos control, con dosis baja y alta de Roundup® respectivamente. Los valores promedio de peso seco libre de cenizas y concentración de clorofila a perifítica para todo el estudio fueron de $2963,72 \pm 2929,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $4,98 \pm 4,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, con rangos de $411,11$ a $14231,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y de $0,11$ a $24,40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de estas variables de masa (Fig. 1.7a-d, ANOVA MR, $p > 0,05$). Se observó para el índice autotrófico una tendencia a aumentar en los mesocosmos tratados hacia el final del experimento (Fig. 7e), con un promedio de 3,5 y 5,2 veces con respecto al t0 para la dosis alta y baja, respectivamente. Pero nuevamente en este caso no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 1.7e, ANOVA MR, $p > 0,05$).



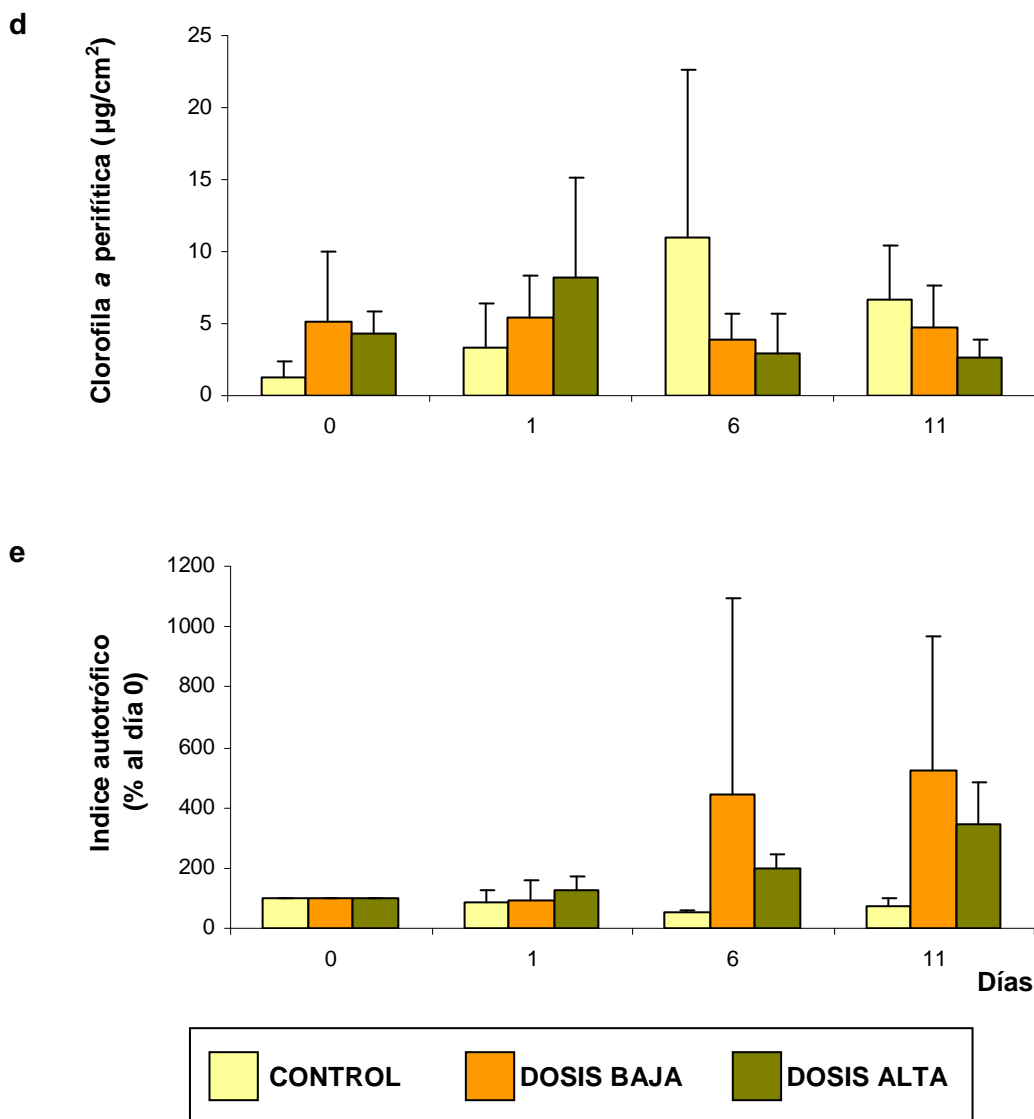


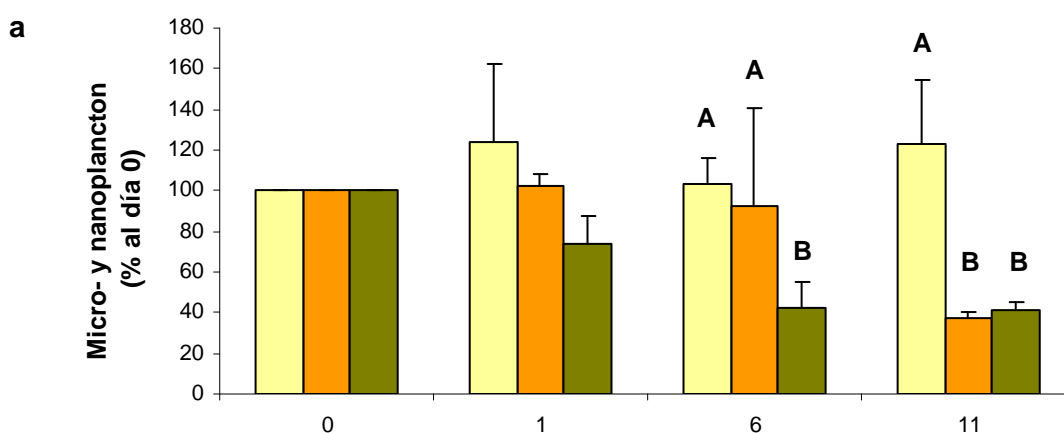
Fig. 1.7. Valores medios de **(a)** peso seco, **(b)** cenizas, **(c)** peso seco libre de cenizas (PSLC), **(d)** concentración de clorofila a perifítica e **(e)** índice autotrófico (PSLC/Chl a perifítica) como porcentaje de los valores iniciales en los distintos tratamientos a lo largo del estudio. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

Efectos sobre el plancton

El rango de abundancias del micro- y nanofitoplancton a lo largo del estudio estuvo entre los $1,99 \times 10^4$ y los $1,48 \times 10^5$ individuos/ml. En este caso también se expresaron los valores de abundancia como porcentaje de los valores de t0 para cada mesocosmos, ya que las réplicas presentaban inicialmente una gran variabilidad (Fig. 1.8a). Las abundancias del micro- y del nanofitoplancton estandarizadas a los valores iniciales mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, en el tiempo, y en la interacción tiempo-tratamiento (ANOVA MR, $p > 0,05$). Hacia el final del experimento, los mesocosmos tratados con ambas dosis del herbicida mostraron una disminución

de 2,5 veces en la abundancia media del fitoplancton con respecto a los valores iniciales (Fig. 1.8a).

Se observó un comportamiento totalmente opuesto de un grupo de algas autótrofas del picoplancton, las picocianobacterias (picy). La abundancia de las picy osciló entre $6,02 \times 10^3$ y $7,80 \times 10^6$ células/ml y se observaron diferencias significativas en el tiempo y en la interacción tiempo-tratamiento (ANOVA MR, $p < 0,05$). La comparación de medias mostró que la abundancia de picy se incrementó significativamente luego de la adición de Roundup® en cualquiera de las dosis (ANOVA MR, $p < 0,005$), pero no en los controles (Fig. 1.8b). Hacia el final del experimento, la abundancia de picy aumentó aproximadamente 40 veces en el tratamiento con dosis alta de herbicida en comparación con los valores iniciales (Fig. 1.8b, ANOVA MR, $p < 0,005$). Por otra parte, la abundancia de los restantes organismos picoplanctónicos, las bacterias heterótrofas (Fig. 1.8c) y picoplancton eucariota, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA MR, $p > 0,05$). Las abundancias medias para todo el período que duró la experiencia fueron $3,29 \times 10^5 \pm 1,31 \times 10^5$ células/ml para las bacterias heterótrofas y $2,73 \times 10^3 \pm 3,24 \times 10^3$ células/ml para el picoplancton eucariota.



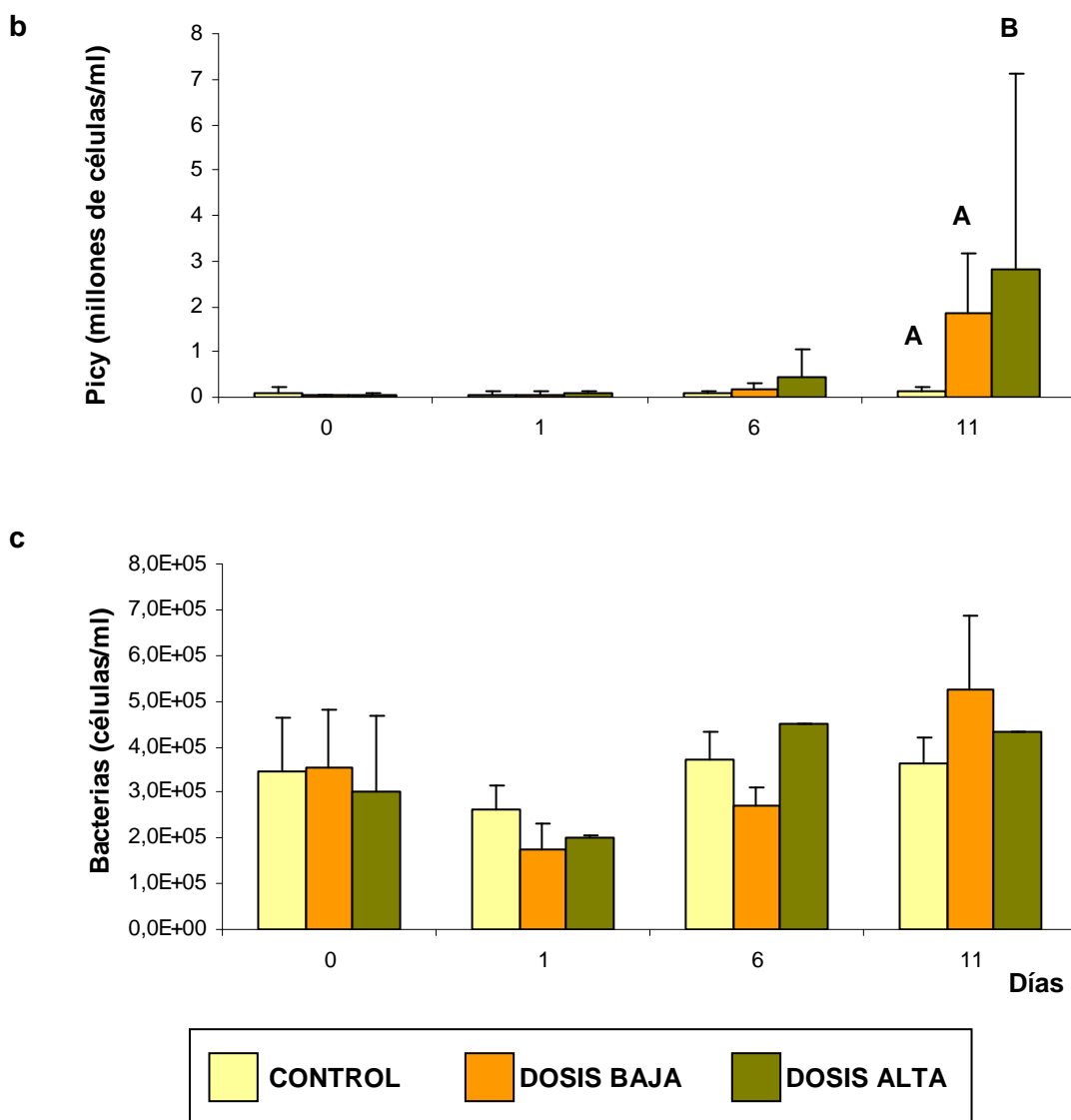


Fig. 1.8. Valores medios de abundancia **(a)** del micro-y nanoplancton como porcentaje de los valores iniciales del día 0, **(b)** de picocianobacterias (picy) y **(c)** de bacterias heterotróficas, a lo largo del estudio en los mesocosmos control y tratados con ambas dosis (baja: 6 mg/l y alta: 12 mg/l). Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) están indicadas con distintas letras. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

La producción primaria fitoplanctónica (PP) promedio fue de $0,20 \pm 0,18 \text{ mg C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, con valores que oscilaron entre 0,03 y $1,02 \text{ mg C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La PP mostró diferencias significativas en el tiempo y en la interacción tiempo-tratamiento (ANOVA MR, $p < 0,05$). La comparación de medias reveló que los mesocosmos tratados con la dosis alta de herbicida experimentaron un aumento del doble en la PP desde el día 0 hasta el día 11 (ANOVA MR, $p < 0,005$). Una tendencia similar, pero no significativa, fue

observada en el tratamiento con la dosis baja (ANOVA MR, $p > 0,05$). Este patrón no fue observado en los mesocosmos control (ANOVA MR, $p > 0,05$).

Características físicas y químicas del agua de los mesocosmos

Las concentraciones iniciales de los iones en los mesocosmos fueron en general uniformes entre las unidades experimentales. El agua de los mesocosmos era alcalina ($7707,90 \pm 747,69$ mg CaCO_3 /litro) y presentaba una conductividad específica de $2,80 \pm 0,25$ mS/cm a 21°C . La composición iónica fue caracterizada por una alta concentración de Na^+ ($808,00 \pm 108,81$ mg/l), Cl^- ($469,96 \pm 108,61$ mg/l) y HCO_3^- ($465,53 \pm 73,85$ mg/l). La temperatura del agua y el pH iniciales fueron $17,60 \pm 0,19^\circ\text{C}$ y $9,40 \pm 0,26$, respectivamente. Las concentraciones de nutrientes mostraron altos valores típicos de condiciones meso-eutróficas. Valores medios iniciales de fósforo total (FT) y N-NH_4^+ fueron $78,77 \pm 11,98$ $\mu\text{g/l}$ y $9,17 \pm 3,56$ $\mu\text{g/l}$, respectivamente.

Durante el experimento, la temperatura del agua fluctuó entre $17,30$ y $21,80^\circ\text{C}$, el pH entre $8,49$ y $9,96$, el oxígeno disuelto entre $5,80$ y $15,00$ mg/litro y la conductividad entre $2,55$ y $3,43$ mS/cm. La concentración de la mayoría de los nutrientes (N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- y FRS) varió en el tiempo, pero no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA MR, $p > 0,05$). La excepción se encontró en la concentración del fósforo total, que mostró un significativo incremento luego de la adición del glifosato en los mesocosmos tratados (ANOVA MR, $p < 0,005$). Las comparaciones múltiples mostraron que los mesocosmos tratados con ambas dosis de Roundup® presentaron un incremento significativo de la concentración de FT desde el día 1 hasta el día 11 (ANOVA MR, $p < 0,005$) y este patrón no fue observado en los mesocosmos control (Fig. 1.9).

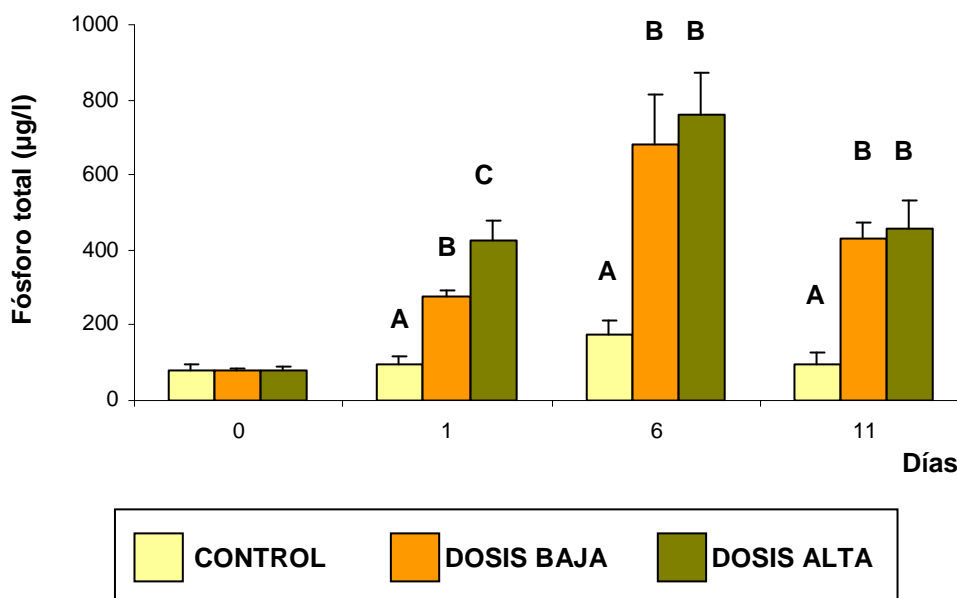


Fig. 1.9. Concentración media de fósforo total en el tiempo que se llevó a cabo el estudio en los distintos tratamientos. Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) están indicadas con distintas letras. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

Las concentraciones de carbono orgánico disuelto fluctuaron entre 3,19 y 12,41 mg/l. La concentración de sólidos totales en suspensión varió entre 2,60 y 50,40 mg/l. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos o entre los tiempos para estas variables (ANOVA MR, $p > 0,05$). La Tabla 1.1 resume las características físico-químicas más importantes de los mesocosmos.

PARÁMETRO	TIEMPO	CONTROL	DOSIS BAJA	DOSIS ALTA
Temperatura (°C)	t0	17,60 ± 0,29	17,63 ± 0,15	17,57 ± 0,12
	t1-t4	20,21 ± 1,20	20,04 ± 1,33	20,09 ± 1,39
pH	t0	9,55 ± 0,31	9,36 ± 0,23	9,24 ± 0,11
	t1-t4	9,3 ± 0,1	9,2 ± 0,1	9,1 ± 0,1
O ₂ disuelto (mg/l)	t0	-	-	-
	t1-t4	13,58 ± 2,75	11,18 ± 3,10	11,69 ± 2,54
Conductividad (mS/cm)	t0	2,82 ± 0,32	2,76 ± 0,27	2,82 ± 0,20
	t1-t4	2,84 ± 0,30	2,81 ± 0,21	2,85 ± 0,17
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /l)	t0	7326,35 ± 908,56	7695,23 ± 123,54	8229,30 ± 750,33
	t1-t4	11214,85 ± 930,41	11007,49 ± 759,15	11830,54 ± 752,17
FT (µg/l)	t0	77,52 ± 18,58	81,01 ± 4,84	78,21 ± 9,68
	t1-t4	119,83 ± 46,41	465,61 ± 202,29	547,49 ± 177,37
FRS (µg/l)	t0	30,71 ± 6,8	27,30 ± 0,00	27,30 ± 0,00
	t1-t4	30,73 ± 9,66	27,20 ± 6,87	30,56 ± 9,16
N-NH ₄ ⁺ (µg/l)	t0	10,86 ± 4,62	8,04 ± 2,79	8,04 ± 2,79
	t1-t4	61,26 ± 57,39	75,08 ± 68,30	63,51 ± 70,21
N-NO ₂ ⁻ (µg/l)	t0	167,69 ± 69,67	168,76 ± 51,93	143,92 ± 115,99
	t1-t4	120,82 ± 71,59	135,73 ± 80,94	126,55 ± 69,39
N-NO ₃ ⁻ (µg/l)	t0	599,97 ± 526,97	517,23 ± 156,88	517,23 ± 490,33
	t1-t4	504,36 ± 331,73	598,53 ± 340,96	529,52 ± 256,53
COD (mg/l)	t0	6,84 ± 3,64	9,19 ± 2,81	5,51 ± 2,26
	t1-t4	6,43 ± 2,21	7,67 ± 2,46	7,35 ± 1,73
STS (mg/l)	t0	18,85 ± 3,42	29,33 ± 19,92	18,73 ± 2,72
	t1-t4	11,04 ± 8,83	8,24 ± 6,76	12,29 ± 9,70
Cl ⁻ (mg/l)	t0	463,31 ± 99,71	474,39 ± 163,11	474,39 ± 106,84
	t1-t4	478,54 ± 104,73	467,00 ± 98,24	467,00 ± 56,22
Na ⁺ (mg/l)	t0	775,00 ± 151,77	850,00 ± 79,37	810,00 ± 87,18
	t1-t4	843,33 ± 106,46	817,78 ± 64,18	825,56 ± 92,75

Tabla 1.1. Características físico-químicas (media ± desvío estándar) de los mesocosmos a tiempo inicial (t0) y luego de la adición del herbicida (t1-t4, promedio desde los días 1 al 11).

Disipación del glifosato

Las concentraciones promedio de glifosato inmediatamente después (1 hora) de su aplicación en los mesocosmos fueron de $12,65 \pm 2,85$ mg/litro (media \pm desvío estándar) en el tratamiento con dosis alta de glifosato, de $5,45 \pm 1,01$ mg/l en el de dosis baja y por debajo del límite de detección ($<0,5$ mg/l) en los controles. Ajustando las concentraciones a una función logarítmica asumiendo una cinética de primer orden ($\ln \text{ glifo} = -0,095 \text{ día} + 1,568$; $p=0,0007$, para la dosis baja y $\ln \text{ glifo} = -0,121 \text{ día} + 2,1341$; $p=0,002$, para la dosis alta), las tasas de disipación (k) estimadas del glifosato fueron similares en ambos tratamientos ($k = 0,095 \pm 0,018 \text{ d}^{-1}$ para la dosis baja y $k = 0,121 \pm 0,028 \text{ d}^{-1}$ para la dosis alta), con vidas medias de 7,32 y 5,74 días en los mesocosmos con dosis baja y alta respectivamente (Fig. 1.10). No se observaron diferencias significativas en la disipación del glifosato entre las dosis (test pareado de t, $p=0,151$).

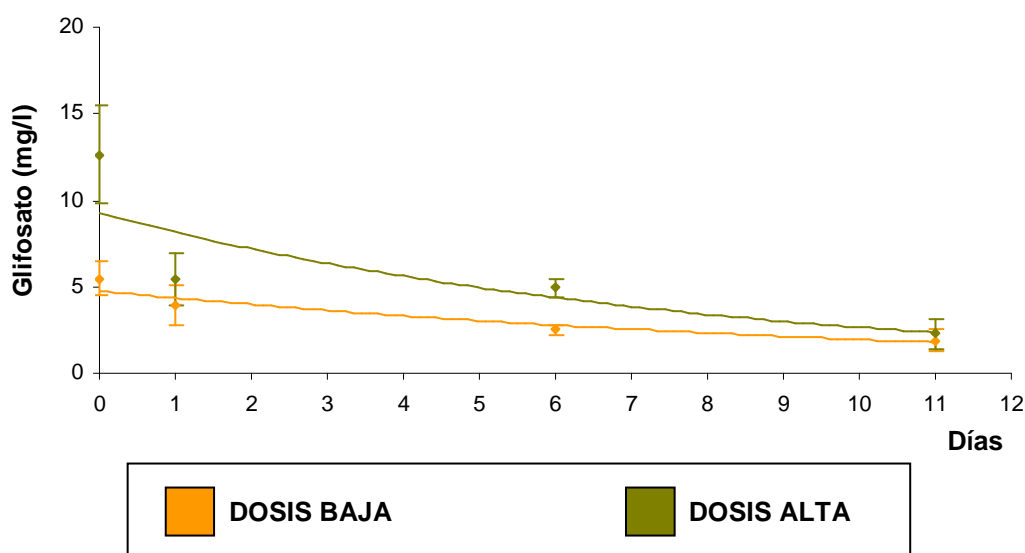


Fig. 1.10. Disipación del glifosato del agua de los mesocosmos a lo largo de la experiencia en los mesocosmos tratados. Las barras de error representan ± 1 desvío estándar.

DISCUSIÓN

Una sola aplicación de cualquiera de las concentraciones ensayadas de Roundup® afectó significativamente la estructura y funcionamiento del sistema experimental en relativamente corto tiempo (menos de 2 semanas). Un importante cambio en la química del agua fue el incremento significativo en la concentración de fósforo total. El formulado comercial Roundup® contiene POEA como surfactante por lo que todo el fósforo del formulado provendría de la molécula de glifosato. En la molécula de glifosato, el fósforo contribuye en un 14% al peso molecular total, por lo tanto las concentraciones de glifosato aplicadas a los mesocosmos, 6 y 12 mg/litro, contribuyen con 840 y 1680 µg/l de fósforo. Estas concentraciones son mayores que aquéllas medidas inmediatamente después de la adición del Roundup® y para el resto de las fechas de muestreo. La cantidad de FT medido en los mesocosmos fue siempre similar o menor que la cantidad prevista por la suma de la concentración inicial de FT más el fósforo suministrado por las concentraciones medidas de glifosato. En otras palabras, el incremento observado en el FT en los mesocosmos tratados se explica por el agregado de glifosato.

El fósforo es uno de los factores más importantes que influyen las comunidades algales, así que los cambios observados en la composición perifítica y fitoplanctónica pudieron haber sido mediados por un efecto indirecto (el incremento del FT), más que por un efecto toxicológico directo del Roundup®. Sin embargo, existen dos evidencias contrarias a la primera alternativa, que indirectamente apoyan la interpretación toxicológica. La primera, como se mencionó más arriba, el exceso de FT puede ser completamente explicado por la presencia del glifosato en solución y, por lo tanto, formando parte de la molécula de glifosato no se encuentra disponible para el crecimiento algal, al menos en el momento que se colectaron las muestras. La segunda evidencia es que varios estudios han demostrado que las algas de mayor tamaño se benefician más que las pequeñas con el aumento del fósforo (Masson *et al.* 2000, Stockner 1988). Pero por el contrario, en nuestro estudio se observó un decrecimiento en la abundancia de las fracciones mayores del fitoplancton y un marcado incremento, de casi 40 veces, en la abundancia de picocianobacterias en respuesta a la adición del glifosato y probablemente, también beneficiadas competitivamente por la disminución del fitoplancton de mayor tamaño. Las cianobacterias son conocidas por ser tolerantes al glifosato ya sea por uno de los siguientes tres mecanismos: la superproducción de EPSPS, por la producción de una enzima tolerante a glifosato (Powell *et al.* 1991, 1992), o mediante la degradación del glifosato y su utilización como fuente de fósforo (Forlani *et al.* 2008, Lipok *et al.* 2007). El incremento significativo de fósforo puede promover condiciones óptimas para el

desarrollo de floraciones de cianobacterias que afectan adversamente la calidad del agua e impactan en la salud humana y animal (Bell y Codd 1996, Carmichael 1994). Por otro lado, el efecto negativo observado en varias especies fitoplanctónicas de gran tamaño es consistente con resultados previos de ensayos de toxicidad unialgales (Gresshoff 1979, Sáenz *et al.* 1997) y experimentos a escala de mesocosmos (Källqvist *et al.* 1994) que utilizan formulaciones de glifosato sin aditivos.

En nuestro experimento la producción primaria fitoplanctónica aumentó en presencia de herbicida aún cuando la densidad fitoplanctónica disminuyó. La PP medida correspondió a la fracción de micro- y nanoplancton ya que se utilizaron filtros GF/F (diámetro de poro $\sim 0,7 \mu\text{m}$) en la filtración del material, los que dejan pasar al picoplancton. Por esta situación se puede inferir que dos situaciones pudieron haber ocurrido para explicar esta aparente incongruencia en los resultados. La primera posibilidad es que los filtros pudieron haberse colmatado con la gran cantidad de picocianobacterias presente en esas muestras y se retuvieron, registrándose el aumento de la PP. La segunda posibilidad pudo involucrar el recambio de especies del fitoplancton de red en los mesocosmos tratados por especies más productivas y tolerantes al herbicida. Sin embargo, no se registró un recambio de especies en las muestras del micro- y nanofitoplancton, por lo tanto nos inclinamos a creer que la primera posibilidad fue la que realmente ocurrió en nuestro estudio. Schaffer y Sebetich (2004) observaron incrementos en la producción primaria fitoplanctónica en laboratorio luego de 7 horas de incubación con el formulado Rodeo[®], que no contiene aditivos, con concentraciones de 0,125 a 12,5 mg de glifosato por litro. En este caso, hay que tener en cuenta que usualmente la productividad microbiana, tanto autotrófica como heterotrófica, se ve estimulada en estudios en microcosmos (Pesce *et al.* 2009).

Existen escasos estudios sobre los efectos del glifosato en las comunidades perifíticas (Hoagland *et al.* 1996) y los pocos que han sido publicados utilizan diferentes diseños experimentales (Austin *et al.* 1991, Goldsborough y Brown 1988, Kish 2006). En el presente estudio, los efectos del Roundup[®] en el perifiton reflejan aquellos efectos observados en el fitoplancton. En particular, se observó una disminución en la densidad total así como un aumento en la cantidad de organismos muertos del perifiton.

Entre las variables perifíticas analizadas, la proporción de organismos vivos/muertos (como % al día 0) fue una de las más relevantes, mostrando hacia el final del experimento una significativa disminución de esta proporción en los mesocosmos tratados con ambas dosis de Roundup[®]. Esta disminución en la proporción vivos/muertos se debió a un aumento en el número de organismos muertos, en particular de diatomeas, en los mesocosmos tratados con ambas dosis.

Esto coincide con lo reportado por Tsui y Chu (2003), que determinaron, en una batería de bioensayos, una sensibilidad al glifosato entre 7 y 10 veces mayor en la diatomea *Skeletonema costatum* que en el alga verde *Selenastrum capricornutum*. De la misma manera, Peterson *et al.* (1994) registraron que la inhibición de la incorporación de carbono debido al Roundup® fue mucho mayor en dos especies de diatomeas en comparación con otras dos especies de algas verdes. Sullivan *et al.* (1981), por otro lado, concluyeron en un estudio a campo, que las variaciones observadas en la abundancia de diatomeas en estanques y arroyos se debieron principalmente a factores ambientales y estacionales y no a la aplicación directa, manual o aérea, de Roundup®.

Así como ocurrió en el fitoplancton, en el perifiton se incrementó la proporción de cianobacterias a expensas de las diatomeas lo que sostiene la percepción general de que las cianobacterias son particularmente tolerantes a ambientes extremos, incluyendo los ambientes con herbicidas (Forlani *et al.* 2008, Powell *et al.* 1991, 1992). En cambio, Kish (2006) encontró un aumento en las algas verdes y diatomeas del perifiton a expensas de la disminución en las cianobacterias debido a la adición de Roundup®.

Existen evidencias contrapuestas relacionadas con los efectos del glifosato sobre las variables de masa perifíticas. Holtby y Baillie (1989) observaron una disminución en la concentración de clorofila a y en la tasa de acumulación de biomasa del perifiton de arroyo en los sitios directamente afectados por una adición de Roundup® dos semanas después de su aplicación. Así también, Kish (2006) observó una disminución en la concentración de clorofila total perifítica con el aumento de la concentración de Roundup®, aunque este decrecimiento no fue estadísticamente significativo. Austin *et al.* (1991) determinaron un comportamiento opuesto del perifiton de arroyo, con un incremento del PSLC y densidades algales, con el agregado de Vision®, otro formulado que contiene glifosato, a muy bajas concentraciones (hasta 300 µg/l). Así también, Relyea (2005a) registró un incremento del peso seco del perifiton con el agregado de Roundup® (3,8 mg i.a./l) en mesocosmos. Sin embargo, este autor atribuye el hecho a un efecto indirecto positivo sobre el perifiton debido a una disminución en los herbívoros por acción del herbicida. En nuestro estudio, no se observa una tendencia clara en las variables de masa perifítica con las distintas concentraciones del herbicida. Esta falta de resultados contundentes se podría relacionar a la marcada heterogeneidad entre las unidades experimentales desde el comienzo de la experiencia. Aunque se respetaron todos los pasos en la construcción y puesta a punto de todos los mesocosmos, encontramos importante variabilidad en algunos parámetros desde el comienzo. Es muy probable que eventos estocásticos,

que tienen lugar en la sucesión de comunidades naturales, puedan provocar la heterogeneidad biológica que pudimos observar entre mesocosmos aledaños. Situaciones semejantes ya fueron descritas en experimentos que involucraron la “construcción” de comunidades naturales (Brandt *et al.* 2004).

La vida media del glifosato en el agua (~6-7 días) fue superior a la mayor parte de los valores reportados en la literatura (vida media <4 días). Estudios de laboratorio y de campo sugieren que el principal mecanismo de remoción del glifosato del agua es la biodegradación y/o adsorción a partículas en suspensión o a los minerales de los sedimentos (Introducción general, página 13), por lo tanto, una disipación más lenta estará asociada a una baja adsorción y/o degradación microbiana. La adsorción del glifosato se incrementa con la cantidad de sólidos en suspensión, decrece con el pH, el contenido de fósforo inorgánico y la concentración de cationes, y está pobremente correlacionada con los parámetros texturales de los sedimentos (Glass 1987, Goldsborough y Beck 1989, Hance 1976, Nomura y Hilton 1977, Rueppel *et al.* 1977, Sprankle *et al.* 1975a, b). La relativamente larga vida media obtenida en este estudio puede estar relacionada, en parte, con la alta concentración de cationes predominante en estos mesocosmos. Goldsborough y Brown (1993) también reportan una disipación más lenta del glifosato en aguas alcalinas (vida media 11,2 días) de estanques de bosques boreales.

En este estudio se ha utilizado una variedad relativamente grande de parámetros bióticos y abióticos para evaluar los efectos potenciales de la contaminación por Roundup® en ambientes acuáticos. Los mesocosmos construidos lograron alcanzar condiciones físico-químicas similares a aquéllas reportadas para lagunas someras de la región (Izaguirre y Vinocur 1994), cuyas aguas son alcalinas, dominadas por bicarbonato de sodio y caracterizadas por un alto grado trófico (Ringuelet 1972, Ringuelet *et al.* 1968). Esto permitió la extrapolación de los resultados obtenidos, aproximándonos a entender lo que está ocurriendo o podría llegar a ocurrir en los cuerpos de agua naturales de esta zona de Argentina, propensos a recibir altas cantidades de glifosato por la intensificación de prácticas agrícolas que involucran la utilización de formulados de glifosato.

CAPÍTULO 2

EFFECTO A LARGO PLAZO DEL ROUNDUP® EN MESOCOSMOS

La dinámica de los diferentes fenómenos ecológicos en distintos sistemas sigue distintas trayectorias, tanto en el espacio como en el tiempo (Wiens 1989). Según Lodge *et al.* (1998), la duración de los experimentos puede abarcar desde minutos hasta muchísimos años y, según estos autores, la duración y el tamaño de los experimentos covarían. Los experimentos, en su mayoría, duran menos de un año debido a distintos factores, como ser, la logística, el financiamiento y la presión de publicar rápidamente por parte de los investigadores. A menudo, el resultado de un experimento puede ser significativamente diferente si la variable temporal se modifica. Los experimentos a gran escala temporal y espacial presentan a menudo mayor realismo ecológico y capacidad predictiva (Deutschman 2001, Wiens 1989). Cuando se realizan estudios de efectos de contaminantes a nivel ecosistémico, además de considerar las modificaciones que puedan estar dadas por el xenobiótico en las poblaciones en particular, también hay que tener en cuenta las modificaciones que puedan estar dadas por las interacciones entre ellas y con el ambiente circundante. Por lo tanto, los estudios a largo plazo garantizan el análisis de tantos efectos como interacciones existen, siendo por lo tanto de gran importancia cuando se llevan a cabo experimentos a un nivel de organización como el de comunidad o ecosistema.

En el presente capítulo se describirá un evento observado en los mesocosmos experimentales, durante un período de un año aproximadamente, lapso transcurrido entre el final del experimento del Capítulo 1 y el comienzo del experimento del Capítulo 3. Nosotros proponemos que este suceso es el resultado del efecto a largo plazo del herbicida en cuerpos de agua someros, representados por los mesocosmos.

En el experimento del Capítulo 1 se utilizaron 10 mesocosmos artificiales para analizar el impacto del Roundup[®] sobre comunidades microbianas. Luego de concluido el estudio, los mesocosmos fueron vaciados y secados para ser llenados nuevamente con agua de pozo. Esta práctica tuvo por objeto el reacondicionamiento de las unidades experimentales y para volverlas a utilizar en un ensayo de colonización y sucesión perifítica (que será explicado en el Capítulo 3). Luego del completo recambio con agua de pozo (aproximadamente 30.000 litros en cada mesocosmos) sin remover los sedimentos del fondo, los mesocosmos se dejaron evolucionar naturalmente hasta el comienzo del segundo experimento, lo que llevó aproximadamente 1 año. El objetivo era obtener nuevamente 10 unidades experimentales idénticas como para ensayar un nuevo experimento factorial. Sin embargo, luego de 1 año los 10 mesocosmos presentaban características limnológicas diferentes, mostrando una variada tipología. Los sistemas eran principalmente

eutróficos, con o sin plantas (macrófitas arraigadas y/o metafiton), presentando desde aguas claras a turbias. La turbidez se debía a componentes orgánicos (fitoplancton) o inorgánicos (material en suspensión). Conformaron un abanico de cuerpos de agua con características semejantes a las de las lagunas someras de la Pampa húmeda Argentina (Allende *et al.* 2009, Izaguirre y Vinocur 1994, Quirós y Drago 1999). En la figura 2.1 se pueden observar algunos de los mesocosmos con distinta tipología.



Fig. 2.1. Mesocosmos “claros” **(a)** con macrófitas y **(b)** con macrófitas y metafiton, “turbios” **(c)** orgánicos e **(d)** inorgánicos.

Con este escenario y antes de dar comienzo al segundo experimento se midieron distintas variables físicas y químicas del agua de cada mesocosmos, que se explican en su totalidad en el Capítulo 3. Dentro de las variables abióticas se midió la disipación de la luz en profundidad a partir de perfiles verticales de mediciones de irradiancia descendente (380–750 nm, cada 1 nm) usando un espectro-radiómetro sumergible (USB2000, Ocean Optics, Dunedin, Florida, USA) en cada mesocosmos. Los perfiles fueron obtenidos alrededor del mediodía. Los coeficientes de atenuación vertical de las radiaciones ultravioleta, $K_d(\text{UV})$, y fotosintéticamente activa, $K_d(\text{PAR})$,

fueron calculados realizando una regresión con las mediciones de irradiancia (transformadas logarítmicamente) *versus* la profundidad, a partir de la ecuación:

$$I_z = I_0 \cdot e^{-K_d \cdot z},$$

donde I_z es la irradiancia a la profundidad z , I_0 es la irradiancia subsuperficial, K_d el coeficiente de atenuación vertical y z la profundidad (Kirk 1994).

También se midieron la turbidez nefelométrica (Tn) y la clorofila *a* fitoplanctónica con un fluorómetro sumergible (SCUFA, Turner®). Los valores de esas variables medidas en el agua de los mesocosmos (E) se muestran en la Tabla 2.1.

Los diez mesocosmos fueron clasificados considerando los perfiles de K_d (UV) y K_d (PAR) *versus* la irradiancia obtenidos para cada mesocosmos (Fig. 2.2), los valores de turbidez nefelométrica y las concentraciones de clorofila *a* fitoplanctónica (Tabla 2.1).

Se distinguieron dos grupos de mesocosmos: los “turbios” (E2, E3, E5, E6, E9 y E10) y los “claros” (E1, E4, E7 y E8) (Tabla 2.1). Los mesocosmos clasificados como “claros” presentaban exclusivamente macrófitas arraigadas, como los mesocosmos E1 y E8 (Fig. 2.1a), o además de plantas contenían matas subsuperficiales de metafiton apreciables a simple vista (E4 y E7, Fig. 2.1b). En el caso de los mesocosmos “turbios”, algunos de ellos contenían íntegramente fitoplancton (*e.g.*, E10) y otros contenían una gran cantidad de sólidos inorgánicos (*e.g.*, E5). En la figura 2.2 se pueden observar claramente los típicos picos de absorción de la clorofila en los mesocosmos “turbios” con gran cantidad de fitoplancton (E3, E9 y E10, Fig. 2.1c). En cambio, los mesocosmos “turbios” con material inorgánico presentaban valores altos de turbidez nefelométrica y bajos de clorofila *a* fitoplanctónica, como los mesocosmos E2 y E5 (Fig. 2.1d, Tabla 2.1).

	Concentración de glifosato (2005)	Turbidez nefelométrica (NTU)	Clorofila <i>a</i> fitoplancton (µg/l)	Aspecto general	Estado
E1	Control	0,80	16,86	Macrófitas	Claro
E2	12 mg i.a./l	9,10	8,43	Inorgánico	Turbio
E3	12 mg i.a./l	1,90	295,84	Orgánico (fitoplancton)	Turbio
E4	Control	1,80	33,71	Macrófitas y metafiton	Claro
E5	6 mg i.a./l	16,40	1,26	Inorgánico	Turbio
E6	12 mg i.a./l	3,50	15,17	Inorgánico y orgánico (fito)	Turbio
E7	6 mg i.a./l	3,50	40,46	Macrófitas y metafiton	Claro

CAPÍTULO 2: Efecto a largo plazo en mesocosmos

E8	Control	0,70	137,38	Macrófitas	Claro
E9	6 mg i.a./l	1,60	94,82	Orgánico (fitoplancton)	Turbio
E10	Control	1,60	255,38	Orgánico (fitoplancton)	Turbio

Tabla 2.1. Concentración de glifosato aplicada en el primer experimento en los distintos mesocosmos (E), turbidez nefelométrica, concentración de clorofila a fitoplanctónica, aspecto general y estado de clasificación (“claro” o “turbio”) del agua de los mesocosmos.

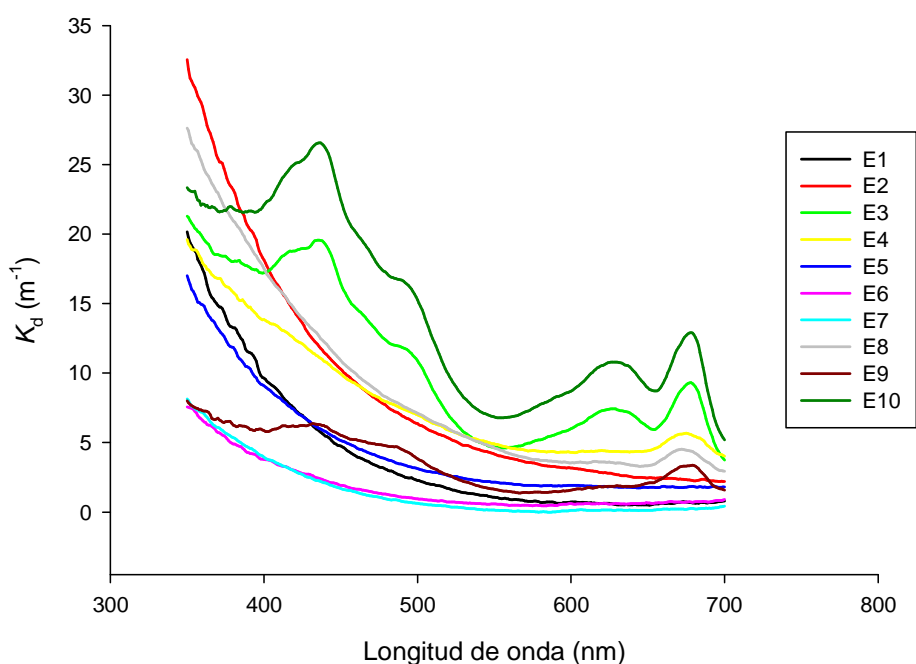


Fig. 2.2. Perfiles de $K_d(\text{UV})$ y $K_d(\text{PAR})$ versus la irradiancia obtenidos para cada mesocosmos (E).

DISCUSIÓN

El fenómeno observado fue muy llamativo para nosotros e inesperado. Luego de finalizado el experimento descrito en el Capítulo 1, decidimos realizar a futuro un segundo experimento utilizando glifosato en los mismos mesocosmos, para lo cual procedimos al vaciado del agua y relleno con agua nueva. Este procedimiento, sumado al hecho de suponer que no quedarían restos disueltos de glifosato dada su corta vida media, nos garantizaba partir de características similares a las obtenidas para el primer experimento. Luego de transcurrido 1 año del reacondicionamiento de los mesocosmos el panorama era muy diferente observándose que los mesocosmos eran muy distintos entre sí, habiendo evolucionado de una manera muy diferente. También en este caso se podría considerar que esta situación había sido el producto de eventos estocásticos que ocurrieron en las sucesiones de las comunidades y en la transformación general de cada mesocosmo, ubicados uno al lado del otro. Sin embargo, nosotros consideramos que este escenario habría sido determinado por la acción del glifosato siendo el producto de un efecto a largo plazo del herbicida.

La mayoría de los mesocosmos clasificados como “turbios” fueron aquellos tratados con glifosato en el experimento previo en tanto que los mesocosmos usados como controles en el primer estudio permanecieron “claros”. Si bien no pudimos analizar estadísticamente este fenómeno, ya que no fue producto de un diseño experimental previo, nosotros podemos sospechar que una sola aplicación de glifosato en el año 2005 desplazó a los mesocosmos hacia un estado “turbio” luego de un año. Si bien removimos los restos de glifosato que pudieron haber quedado en la columna de agua, es probable que moléculas de glifosato hayan permanecido adsorbidas a los sedimentos no removidos. Tal como fuera mencionado en la Introducción general de esta tesis, la persistencia del glifosato en los cuerpos de agua es mucho mayor si se considera su adsorción a sedimentos, siendo mayor si son ricos en óxido de hierro y de aluminio (Gimsing y dos Santos Afonso 2005).

De acuerdo a estas suposiciones una baja tasa de desorción, luego de llenados los mesocosmos con agua, pudo haber producido un efecto a largo plazo suprimiendo el crecimiento de los grupos más sensibles y favoreciendo las habilidades para competir de las algas más resistentes. Esta tendencia de efecto a largo plazo fue sugerida por Holtby y Baillie (1989) quienes reportaron un aumento de la producción perifítica como respuesta a altos niveles de fósforo producidos por una sola aplicación de Roundup[®] realizada 1 año antes en arroyos naturales.

También hipotetizamos que los mesocosmos tratados en el primer estudio, podrían contener en sus sedimentos propágulos de diferentes organismos que fueran

distintos a los que persistieron en los mesocosmos control, los que generaron comunidades biológicas muy distintas entre los cuerpos de agua.

Un diseño experimental *ad hoc* para probar el efecto a largo plazo del glifosato en los mesocosmos debería tener en cuenta que:

- una vez vaciadas las unidades experimentales y antes de llenarlas con agua nuevamente se debería medir la concentración de glifosato en los sedimentos y realizar un análisis microscópico de los organismos presentes en los sedimentos,

- después de llenar con agua los mesocosmos y antes de comenzar la segunda experiencia se debería medir la concentración de glifosato en toda la columna de agua. De esta manera, probablemente podríamos haber encontrado perfiles de concentraciones y hubiéramos comprobado tal vez un aumento en la cercanía del fondo en los mesocosmos “turbios” y no en los “claros”.

El enriquecimiento de los sistemas de agua dulce relacionado con la adición de glifosato ha sido reportado en la literatura (Austin *et al.* 1991). En este sentido, la posibilidad de aceleración del proceso de eutroficación y sus consecuencias para los ambientes naturales son serias. En estas situaciones, la ecología de todo el sistema se convierte hacia condiciones donde las propiedades físicas y químicas del agua producen una disminución en la biodiversidad con la aparición de especies tolerantes y/o especies que desarrollan poblaciones resistentes que pueden crecer explosivamente. Una de las floraciones de cianobacterias más comunes y potencialmente tóxicas, son las de *Microcystis aeruginosa*, usualmente detectada en cuerpos de agua de todo el mundo, incluyendo las lagunas someras de la región Pampeana (Izaguirre y Vinocur 1994). Forlani *et al.* (2008) han demostrado que esta especie es capaz de utilizar el glifosato como fuente de fósforo. Por lo tanto, estas cianobacterias no sólo no son afectadas adversamente por el glifosato sino que su desarrollo es estimulado por el herbicida ya que lo utilizan directamente empeorando la condición ecológica general de las lagunas someras cercanas a los campos de cultivo en donde se aplica glifosato.

En las últimas décadas la agricultura se intensificó dentro de la Pampa húmeda (Mugni *et al.* 2005) y el consumo de agroquímicos se incrementó bruscamente. Quirós *et al.* (2002a) sugirieron que la mayoría de las lagunas someras pampeanas se encontraban en un estado “claro” al inicio de este proceso y que ahora se han desplazado a un estado “turbio”. Su trabajo principalmente discute el efecto de la intensidad de uso de la tierra, presentando evidencia de que las cargas de nutrientes en los cuerpos de agua de la región se han incrementado como consecuencia del accionar de los humanos con la mayor intensidad de uso de sus cuencas de drenaje, desplazando las lagunas de una fase “clara” a una “turbia”. En el presente capítulo se

mostró que una sola aplicación de glifosato pudo producir un cambio a largo plazo en la tipología de los cuerpos de agua y estaríamos en condiciones de extender a los herbicidas como el glifosato dentro de los responsables de generar la tendencia regional de cambio en las lagunas someras sugerida por Quirós *et al.* (2002a, 2006).

En la Argentina, tanto los fertilizantes como los pesticidas con fósforo incrementan la carga de nutrientes a los cuerpos de agua. Los agricultores generalmente mezclan el glifosato con insecticidas para producir un cóctel para la aplicación sobre los campos cultivados con soja (Jergentz *et al.* 2005). De la cantidad total de insecticidas utilizados en las áreas cultivadas con soja en Buenos Aires, el organofosforado clorpirifos se encuentra en el segundo lugar (Jergentz *et al.* 2004, Mugni *et al.* 2010). Si tenemos en cuenta el creciente uso del herbicida glifosato y de los insecticidas organofosforados asociados a él, el potencial de eutroficación a largo plazo de los cuerpos de agua naturales, es un hallazgo de enorme importancia que va en detrimento de la calidad del agua de los ecosistemas dulceacuícolas, modificando su estructura y funcionamiento, y conduciéndolos a convertirse en sistemas hipertróficos altamente turbios. Esta situación, además de disminuir su utilización como recurso, podría estar generando riesgos para la salud humana y ambiental en general (Quirós *et al.* 2006).

CAPÍTULO 3

IMPACTO DEL ROUNDUP® EN LA COLONIZACIÓN Y SUCESIÓN DE LA COMUNIDAD PERIFÍTICA DE AGUA DULCE: ESTUDIO EN MESOCOSMOS

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas acuáticos naturales se ven regularmente alterados por perturbaciones antropogénicas, entre las cuales podemos incluir a la exposición a una gran cantidad de pesticidas (Battaglin *et al.* 2005, 2009, Kimbrough y Litke 1996, Kolpin *et al.* 2006, Palma *et al.* 2004, Struger *et al.* 2008) que tienen el potencial de causar cambios dramáticos en las comunidades naturales (deNoyelles *et al.* 1982, Gustavson *et al.* 2003, Relyea 2005a, Rohr y Crumrine 2005).

El glifosato es utilizado en formulados, como ya se destacó en la presente tesis, razón por la cual la mayoría de los estudios de impacto del glifosato en los ambientes acuáticos se han desarrollado utilizando diferentes formulados. Entre estas formulaciones comerciales, una de las más utilizadas en estudios de impacto es el Roundup® (Cavalcante *et al.* 2008, Costa *et al.* 2008, Goldsborough y Brown 1988, Holtby y Baillie 1989, Kish 2006, Langiano y Martinez 2008, Relyea 2005a, b, Relyea *et al.* 2005, Tsui *et al.* 2005). También se han realizado experiencias utilizando los formulados Vision® (Austin *et al.* 1991) y Rodeo® (Henry *et al.* 1994, Schaffer y Sebetich 2004, Solberg y Higgins 1993), de los cuales este último no posee aditivos.

El perifiton es una muy importante comunidad en los ecosistemas acuáticos y su rol es muy significativo en los lagos someros donde existe una gran variedad de hábitats para su establecimiento si consideramos la gran proporción de áreas litorales de estos ambientes. Su importancia en términos de producción es evidente en las aguas "claras" donde su contribución a la producción microbiana total del sistema es más del 77%, mayor que la del fitoplancton (Liboriussen y Jeppesen 2003). Ya se ha explicado en la Introducción del Capítulo 1 (página 26) la importancia del perifiton como herramienta para las investigaciones de monitoreo de la calidad del agua y los atributos de esta comunidad que se utilizan para estudiar la respuesta a una perturbación. Algunos estudios se han focalizado en los efectos del Roundup® en las características estructurales (Holtby y Baillie 1989, Kish 2006, Relyea 2005a) y funcionales de la fracción algal perifítica. Goldsborough y Brown (1988) analizaron los efectos del Roundup®, en un rango de concentraciones desde 0,0089 µg/l a 890 mg/l, sobre la fotosíntesis de las algas de comunidades perifíticas naturales usando la técnica de asimilación de ¹⁴C. Esta técnica también ha sido utilizada para estudiar los impactos del Rodeo®, otro herbicida a base de glifosato, pero sobre la producción primaria del fitoplancton (Schaffer y Sebetich 2004).

Varios factores, entre ellos la radiación UV y los pesticidas, pueden afectar y limitar el desarrollo perifítico sobre nuevos sustratos (Guasch *et al.* 1997, Vinebrooke y Leavitt 1996) pudiendo poner en riesgo la ocupación de nuevos hábitats. Existen pocos estudios que analicen los efectos de contaminantes acuáticos sobre la

colonización y sucesión del perifiton (Guasch *et al.* 1997) y se ha encontrado solo uno en el cual se utiliza un formulado de glifosato, Vision[®], para analizar los impactos sobre la composición de especies y la acumulación de biomasa perifítica (Austin *et al.* 1991).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento del Capítulo 1 referente al efecto del Roundup[®] sobre la comunidad perifítica ya establecida sobre sustratos artificiales, se propuso realizar un nuevo ensayo similar para estudiar otro aspecto muy importante de la comunidad, la dinámica de colonización y sucesión. El **objetivo general** del presente estudio fue investigar el efecto del formulado de glifosato, Roundup[®], sobre la dinámica de acumulación de biomasa perifítica de cuerpos de agua con propiedades limnológicas similares a aquéllas de la Pampa húmeda de la Argentina. Se analizó la colonización y sucesión del perifiton a través de caracteres estructurales y funcionales de la comunidad desarrollada sobre sustratos artificiales ubicados en mesocosmos que simulaban diferentes ecosistemas de agua dulce. Los resultados obtenidos en este estudio han sido reportados en el trabajo de Vera *et al.* (2010).

Los **objetivos específicos** que se plantean consisten en realizar en escenarios con y sin Roundup[®]:

- (1) estudios taxonómicos y cuantitativos de la fracción algal de la comunidad perifítica durante la colonización y sucesión sobre sustratos artificiales.
- (2) análisis de las distintas fracciones de masa perifítica sobre sustratos artificiales evaluando peso seco, cenizas, peso seco libre de cenizas y clorofila *a*.
- (3) estimación de la producción primaria perifítica.
- (4) estudio de las variables físico-químicas del agua de los mesocosmos mediante la medición *in situ* y análisis en laboratorio.

Hipótesis

Se estima que en los mesocosmos tratados con Roundup[®]:

- H1: se afectará la colonización y sucesión de la fracción algal de la comunidad.
- H2: habrá una mayor mortalidad algal en cada etapa de la sucesión con respecto a los mesocosmos no tratados.
- H3: se registrará una disminución de la masa total perifítica en cada etapa de la sucesión.
- H4: habrá un decrecimiento en la producción primaria de la comunidad perifítica en relación a los mesocosmos no tratados en cada etapa de la sucesión.

Las cianobacterias son organismos que pueden soportar ambientes extremos y poseen mecanismos de tolerancia al glifosato, por lo tanto, proponemos que:

H5: la densidad de cianobacterias perifíticas aumentará con la adición de Roundup®.

La adición de glifosato, que contiene fósforo en su molécula, provocará:

H6: un aumento del fósforo total en el agua de los mesocosmos tratados con herbicida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Este experimento fue llevado a cabo entre abril y junio del año 2006, en el IIB-INTECH, Chascomús. En el estudio se utilizaron los 10 mesocosmos artificiales ya descritos en los Capítulos 1 y 2. Éstos resultaron entonces presentar la misma morfometría pero diferentes propiedades limnológicas, algunos con aguas “claras” con macrófitas y/o metafiton y otros con aguas “turbias” con presencia importante de fitoplancton o materia inorgánica en suspensión. Al comienzo del experimento, cinco mesocosmos fueron seleccionados al azar y tratados con Roundup® con el fin de obtener una concentración inicial de 8 mg de glifosato (i.a.)/litro en la columna de agua. Los restantes cinco mesocosmos fueron dejados sin adición de Roundup® (controles). La concentración nominal de glifosato fue elegida para ser comparable e intermedia con las concentraciones ensayadas en el experimento previo (Capítulo 1). La concentración de glifosato utilizada se encuentra cerca del margen superior del rango revisado por Relyea (2006) calificado como de los peores escenarios posibles que pueden encontrarse en la naturaleza, entre 1,4 (gobierno de Canadá) y 10,3 mg i.a./litro (Mann y Bidwell 1999).

Las muestras de agua fueron colectadas de cada mesocosmos usando una botella tipo Van Dorn. Las primeras muestras fueron tomadas inmediatamente antes de la aplicación del herbicida (t₀), excepto aquéllas para la determinación del glifosato que fueron obtenidas inmediatamente después de la aplicación. El resto de las muestras fueron colectadas 3, 8, 14, 28 y 42 días luego de la adición del Roundup® (t₁–t₅, respectivamente). Las muestras de agua fueron transportadas al laboratorio en botellas de plástico de 5 litros, a partir de las cuales se obtuvieron las submuestras para las determinaciones de glifosato y los análisis de las variables físicas, químicas y biológicas. El estudio de la comunidad perifítica fue desarrollado utilizando sustratos artificiales que fueron colocados en cada mesocosmos al comienzo del experimento.

Variables físicas y químicas del agua de los mesocosmos

Los análisis físicos y químicos fueron llevados a cabo antes de la adición y a los 3, 8, 14, 28 y 42 días luego de la aplicación del Roundup®. La conductividad (conductímetro Hach®), el pH (Orion pH-metro) y la concentración de oxígeno disuelto (YSI 5000 metro) fueron medidos *in situ* en cada fecha de muestreo. Con el objetivo de analizar la variación diaria, la temperatura del agua se registró sub-superficialmente a lo largo de todo un día coincidiendo con el t₅ en los mesocosmos E1 y E3 con un Data Logger THERMOBUTTON. Se calcularon los coeficientes de atenuación vertical de la

radiación fotosintéticamente activa, $K_d(\text{PAR})$, y se midieron los valores de turbidez nefelométrica (Tn) y de clorofila a fitoplanctónica (Chl a) como se explicó en el Capítulo 2.

El agua para las determinaciones de los principales iones y nutrientes fueron filtradas inmediatamente después de tomadas las muestras a través de filtros Whatman® GF/C. Se determinaron fósforo total, fósforo reactivo soluble, nitrato, nitrito, amonio, calcio, magnesio, sodio, potasio, bicarbonato, sulfato y cloruro de la misma manera, siguiendo APHA (2005), que fue descrito en la página 34 del Capítulo 1. Los análisis físicos y químicos del agua de los mesocosmos fueron realizados por los Dres. Bonetto y Mugni en el ILPLA y por el Dr. Pérez y el Lic. Lagomarsino en el IIB-INTECH.

Los análisis de concentración de glifosato fueron llevados a cabo, inmediatamente después de la adición del glifosato en todos los mesocosmos y en cinco ocasiones más (2, 8, 10, 11 y 14 días) en cada mesocosmos tratado, a partir de muestras de agua filtradas a través de filtros de membrana de 0,45 μm . El análisis fue realizado mediante HPLC de fase reversa previa derivatización con cloruro de FMOC, siguiendo a Miles *et al.* (1986). Estos análisis fueron efectuados por la Dra. Ferraro y el Dr. Pérez en el INTECH.

Análisis del perifiton

Los sustratos artificiales a utilizar para el análisis del perifiton consistieron en tiras transparentes de policarbonato de aproximadamente 7 cm de largo por 2 cm de ancho y 1 mm de espesor. Cada sustrato fue marcado en una de sus caras con un rótulo inocuo (Fig. 3.1). Para la instalación y sostén de los sustratos en el agua se utilizó un dispositivo especial (perifitómetro) de acrílico transparente, de aproximadamente 34 cm de largo por 4,5 cm de ancho y 10 cm de alto (Fig. 3.1). Los perifitómetros, asegurados con cuerdas al borde de cada mesocosmos, fueron suspendidos en marcos especiales para su flotación, aproximadamente 10 cm por debajo de la superficie del agua en cada mesocosmos al comienzo del experimento. Se dejaron los sustratos para colonizar y se colectaron las muestras a los 8, 14, 28 y 42 días de adicionado el herbicida.

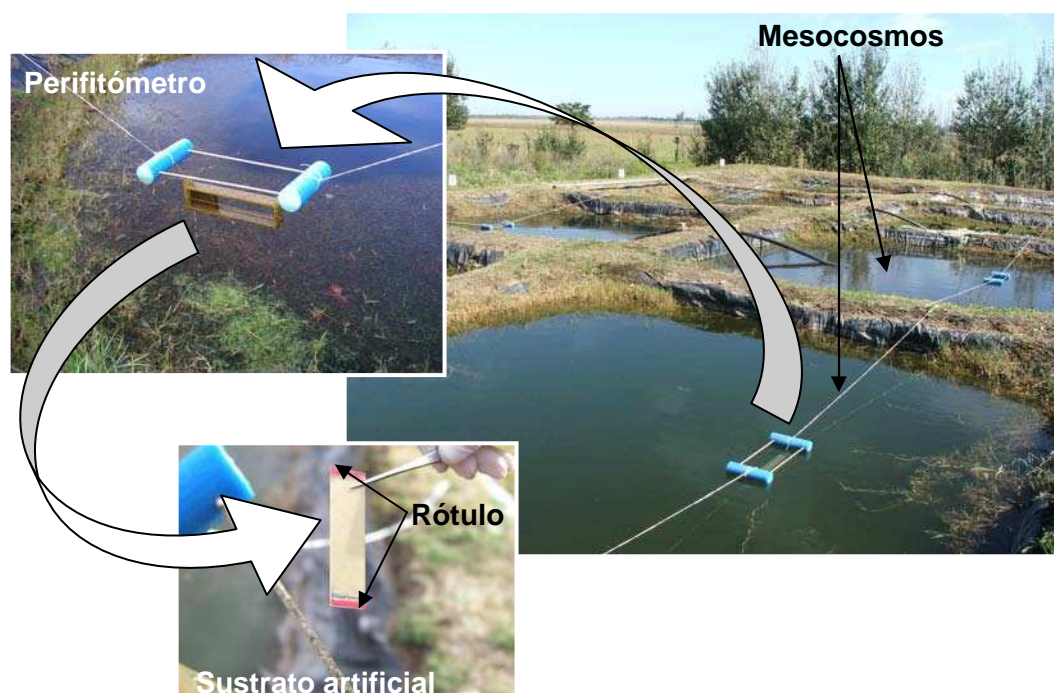


Fig. 3.1. Ubicación de los perifitómetros utilizados durante la experiencia en los mesocosmos. Detalle de un perifitómetro y de un sustrato artificial. Se señala el rótulo inocuo sobre el sustrato colonizado.

En cada fecha de muestreo se extrajo de cada uno de los mesocosmos una cantidad determinada de sustratos colonizados, los que fueron llevados en oscuridad al laboratorio para el posterior procesamiento. El perifiton de cada sustrato fue removido por raspado de la superficie y llevado a un volumen conocido con agua destilada, el que fue dividido en alícuotas para los diferentes análisis. Todas las variables perifíticas se expresaron por unidad de área.

Las muestras para las determinaciones algales cualitativas fueron fijadas con formaldehído al 2%. En el laboratorio se procedió a la identificación taxonómica de los componentes algales de la comunidad perifítica bajo microscopio óptico, equipado con cámara clara, a un aumento de 1000x. Para la identificación específica de las Bacillariophyta (diatomeas) se realizaron preparados permanentes según fuera descrito en la página 31 del Capítulo 1. Para la determinación taxonómica se empleó la bibliografía detallada en la página 32 del Capítulo 1. Se calculó la frecuencia de aparición de los organismos determinados al menor taxón posible en los distintos mesocosmos (réplicas) según los tratamientos aplicados (sin y con Roundup®) y el tiempo de muestreo. De esta manera se adjudicaron los valores 5, 4, 3, 2, 1, 0 según la cantidad de mesocosmos donde fue hallado cada organismo (5: presencia en los cinco mesocosmos, 4: presencia en cuatro réplicas, 3: presencia en tres réplicas, 2:

presencia en dos réplicas, 1: presencia en una réplica, 0: ausencia del taxón) para cada tiempo de la experiencia y para cada tratamiento.

Se calculó el índice de Jaccard con los organismos de la comunidad perifítica identificados, evaluando de esta manera la similitud taxonómica entre los mesocosmos control y los adicionados con Roundup® en cada fecha de muestreo. Este índice se calculó como:

$$J = C / (A + B + C),$$

donde **A** es el número de especies que sólo ocurren en los mesocosmos control, **B** es el número de especies que sólo ocurren en los mesocosmos tratados con herbicida y **C** es el número de especies que ocurren en ambos tratamientos (Crisci y López Armengol 1983).

Las muestras para los análisis cuantitativos fueron preservadas con solución de lugol acético al 1%. Los recuentos se hicieron por el método de Utermöhl (1958) con un error <15%, estimado según Venrick (1978). En el caso de los individuos con ramificaciones, filamentos y agregados celulares se estableció el criterio a partir del cual los individuos fueron considerados como unidad, a saber: al contar 5 células se consideró un individuo para las algas verdes *Pallmella mucosa*, *Stigeoclonium* sp. y *Coelastrum* sp. y en el caso de las cianobacterias se utilizó 10 células/individuo en *Leptolyngbya foveolarum* y 4 células/individuo para *Eukapsis* sp. y *Merismopedia hyalina*. Los individuos muertos se consideraron de la manera explicada en el Capítulo 1. La identificación y recuento de las algas perifíticas fue llevado a cabo por el Lic. Sylvester en el Laboratorio de Limnología de la FCEyN, UBA.

Las distintas fracciones de masa del perifiton (PS, C y PSLC) se estimaron de la manera que descripta en la página 32 del Capítulo 1. Se estimó también el índice autotrófico (APHA 2005, Lowe y Pan 1996). La concentración de clorofila *a* perifítica (P-Chl *a*) fue estimada a partir del material raspado y filtrado a través de filtros Whatman® GF/F. El tratamiento de los filtros, la extracción y medición de los pigmentos se realizó como fue descripto en la página 32 del Capítulo 1. La determinación de la concentración de clorofila *a* fue llevada a cabo por el Dr. Pérez.

Antes de la colonización, los sustratos fueron rotulados en una de sus caras (Fig. 3.1) para poder reconocer posteriormente la cara que sería expuesta directamente a la radiación durante la incubación para la estimación de la producción primaria del perifiton. La producción primaria perifítica (PP) fue estimada mediante la técnica de asimilación de ¹⁴C (Steeman-Nielsen 1952). Para cada mesocosmos, se llenaron 2 tubos (réplicas) de acrílico transparente de 70 ml (corte neto a 400 nm) con agua del mesocosmos filtrada por red de 15 µm de poro, a los que se les colocó un sustrato colonizado. Antes de introducir el sustrato en el tubo, se le eliminó por

raspado la mayor cantidad de material posible a la cara del sustrato que no se encontraba marcada. Además, se utilizó un tubo oscuro (recubierto con papel aluminio) por mesocosmos para estimar la incorporación de ^{14}C en oscuridad (control oscuro). A cada tubo se le adicionó en oscuridad un inóculo de $3\ \mu\text{Ci}$ de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Los tubos se colocaron a incubar al mediodía durante 2 horas. Para evitar el aumento de temperatura dentro de los tubos por efecto de la exposición a la radiación solar, los tubos se colocaron en un bastidor de altura regulable que se colocó dentro de una pileta justo por debajo de la superficie del agua, a modo de baño termostático (Fig. 3.2). La incubación se realizó a niveles de irradiancia saturante sin fotoinhibición (desde $41,85$ a $104,54\ \text{W/m}^2$), utilizando un filtro de densidad neutra. Los niveles de irradiancia se decidieron en función de una curva de producción *versus* irradiancia que se realizó previamente. La radiación solar incidente (PAR) en la superficie del agua fue medida en el lugar utilizando un radiómetro portátil Eldonet (Real Time Computers, Inc. 4) simultáneamente a la determinación de la PP. Luego de la incubación los tubos fueron trasladados al laboratorio en frío y oscuridad para su inmediato procesamiento. En el laboratorio se raspó el material de la cara del sustrato expuesta a la luz (marcado con el rótulo). El material raspado fue filtrado a través de filtros Whatman® GF/F. Estos filtros se colocaron dentro de viales de centelleo (4 ml) en una atmósfera saturada de ácido clorhídrico y luego fueron secados sobre una plancha calefactora en campana durante una noche. Se agregaron a cada vial 2,5 ml de solución de centelleo (OptiPhase 'HiSafe'3, Van Nuys, California, USA) y se midió la actividad de los filtros en un contador de centelleo (Beckman LS 5000TD 10, Fullerton, California, USA). La asimilación de ^{14}C en oscuridad (control oscuro) se sustrajo de las estimaciones de PP. La concentración de carbono inorgánico disuelto (CID) se estimó a partir de la alcalinidad por titulación Gran, el pH y la temperatura (Stumm y Morgan 1996). La estimación de la producción primaria perifítica se llevó a cabo con la colaboración de las Dras. Torremorell y Rodríguez en el INTECH.

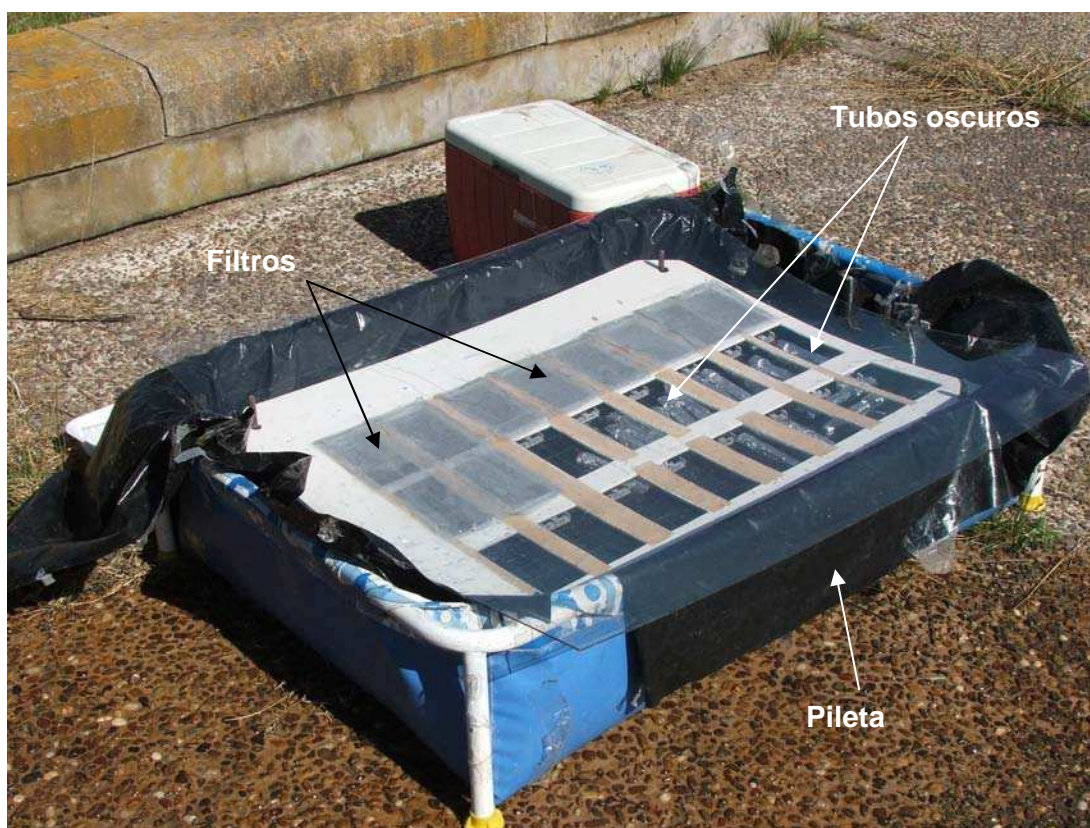


Fig. 3.2. Pileta utilizada para la incubación de los sustratos artificiales para estimar la producción primaria perifítica. Se señalan los filtros de densidad neutra y los tubos oscuros en el interior de la pileta.

Análisis estadístico

Se utilizó el test de ANOVA no paramétrico por rangos, Kruskal–Wallis (KW), para comparar las variables químicas del agua de los mesocosmos “claros” y “turbios” al t_0 y entre tratamientos a lo largo del experimento. Se llevaron a cabo análisis de regresiones lineales simples para cada tratamiento, para las variables perifíticas transformadas logarítmicamente *versus* el tiempo. Antes de cada análisis de regresión, se aplicaron los tests de Kolmogorov–Smirnov y de Levene para probar la normalidad y homocedacia de los datos, respectivamente. Se llevaron a cabo análisis de regresión con variables auxiliares para probar la homogeneidad entre las pendientes, y las diferencias entre las ordenadas al origen fueron ensayadas usando procedimientos de análisis de varianza ($p < 0,05$) (Zar 1996).

RESULTADOS

Efectos del Roundup® sobre la comunidad perifítica

Del análisis taxonómico de las muestras, se obtuvo un total de 29 especies en los mesocosmos tratados con Roundup® y 31 en los controles. Conforme con la identificación de los organismos al menor taxón posible, se confeccionó una tabla en la cual se detalló la frecuencia de aparición de cada uno en los distintos mesocosmos (réplicas) según el tratamiento, control o con Roundup® (Tabla 3.1).

Taxones	CONTROL				ROUNDUP®				
	Días				Días				
	8	14	28	42	8	14	28	42	
BACILLARIOPHYTA	<i>Achnantes minutissima</i>	5	5	5	5	4	3	4	5
	<i>Amphiprora</i> sp.	1	0	0	1	0	0	0	0
	<i>Amphora veneta</i>	5	4	5	5	5	5	4	5
	<i>Anomoeoneis sphaerophora</i>	1	0	0	0	1	0	0	1
	<i>Cocconeis placentula</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	4	2	2	4	5	3	1	4
	<i>Cymbella</i> sp.	0	2	3	2	2	2	2	3
	<i>Fragilaria capuchina</i>	3	2	2	3	0	0	0	0
	<i>Gomphonema parvulum</i>	4	3	4	4	4	3	2	5
	<i>Navicula pigmea</i>	0	0	0	0	1	0	0	0
	<i>Navicula veneta</i>	3	3	1	4	4	3	1	3
	<i>Nitzschia</i> sp.	5	4	4	3	5	1	5	4
<i>Surirella ovalis</i>	1	0	0	1	1	0	0	0	
<i>Synedra ulna</i>	1	1	2	2	1	0	0	1	
CHLOROPHYTA	<i>Chlamydomonas</i> sp.	2	0	1	2	1	3	5	2
	<i>Closterium leibleinii</i>	2	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Coelastrum microporum</i>	2	2	2	1	2	3	2	2
	<i>Cosmarium</i> sp.	1	1	1	1	3	2	1	2
	<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>	0	1	1	0	1	2	1	1
	<i>Eutetramorus fotii</i>	1	0	1	0	0	0	0	0
	<i>Monoraphidium contortum</i>	2	1	1	1	4	3	2	1
	<i>Pallmella mucosa</i>	3	3	3	3	2	3	4	3
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0	2	1	0	2	3	2	2
	<i>Stigeoclonium</i> sp.	4	4	4	4	2	2	3	3
<i>Tetraedron minimum</i>	2	2	1	1	1	2	1	2	
CYANOBACTERIA	<i>Chamaesiphon minutus</i>	2	1	3	2	2	2	4	1
	<i>Chroococcus turgidis</i>	3	3	4	3	5	5	5	5
	<i>Coenocystis tapasteana</i>	0	0	0	1	0	0	0	0
	<i>Eukapsis</i> sp.	2	2	2	2	4	4	4	3
	<i>Franceia amphitricha</i>	0	0	0	0	0	1	1	1
	<i>Gloeocapsa granosa</i>	0	0	0	0	0	1	0	1
	<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	4	3	5	3	3	4	4	5
	<i>Limnothrix redekei</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
	<i>Merismopedia hyalina</i>	2	1	2	3	3	4	4	3
	<i>Phaeocapsa</i> sp.	0	1	0	0	0	1	1	0

Tabla 3.1. Frecuencia de aparición de los organismos hallados en los mesocosmos. Los valores 0 a 5 denotan la cantidad de mesocosmos donde fue hallado cada taxón para cada tiempo de la experiencia y para cada tratamiento.

Se registró una mayor frecuencia de aparición de diatomeas en los mesocosmos sin herbicida (122 en los controles y 103 en los tratados), mientras que las cianobacterias y las algas verdes tuvieron una mayor frecuencia de aparición en los mesocosmos con Roundup® (cianobacterias: 82 en los mesocosmos tratados y 54 en los controles y verdes: 80 en los tratados y 654 en los controles).

El índice de Jaccard aplicado a la comunidad del perifiton reveló para cada tiempo los siguientes valores: t2=0,70; t3=0,78; t4=0,81 y t5=0,67. Puede establecerse una semejanza taxonómica entre el 70% y el 80% entre los mesocosmos sin y con Roundup®. Del total de taxones encontrados (35), 6 fueron exclusivos del tratamiento control y 4 del tratamiento con herbicida.

La abundancia algal total promedio del perifiton (organismos vivos+muechos) estuvo en los rangos de $9,62 \times 10^4$ a $88,21 \times 10^4$ individuos/cm² y de $7,45 \times 10^4$ a $63,42 \times 10^4$ indiv./cm² en los mesocosmos control y tratados con Roundup®, respectivamente. Comparando las rectas de regresión obtenidas a partir de las variaciones temporales de la abundancia total algal, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ya que las rectas presentaron valores similares de pendiente ($p=0,667$) y no se registraron diferencias significativas entre las ordenadas al origen ($p=0,196$; Tabla 3.2). Esta variable mostró siempre valores mayores en los mesocosmos control, y a pesar que se incrementó desde el inicio del experimento, se observó una disminución en la última fecha de muestreo, tanto en los mesocosmos control como en los tratados (Fig. 3.3).

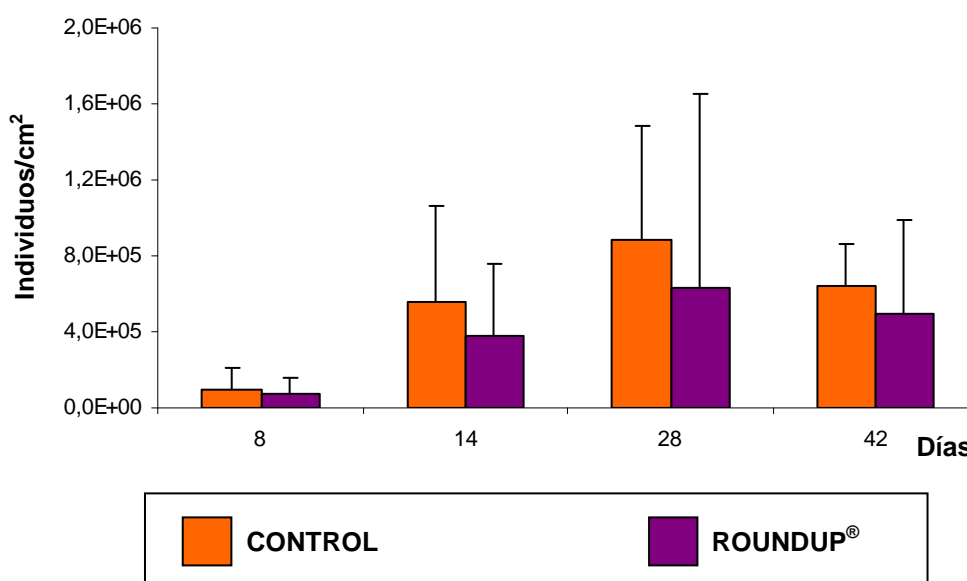


Fig. 3.3. Abundancia promedio de algas totales (vivas+muertas) del perifiton en los mesocosmos control y tratados con Roundup® a lo largo del experimento. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

	Ordenada (media ± EE)		Pendiente (media ± EE)	
	CONTROL	ROUNDUP®	CONTROL	ROUNDUP®
Ind. totales	4,68 ± 0,28	4,56 ± 0,33	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	(p=0,196)		(p=0,667)	
Diatomeas	4,37±0,37	3,58 ± 0,46	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02
	(p=0,026)		(p=0,815)	
PS	2,03 ± 0,16	1,51 ± 0,29	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	(p=0,002)		(p=0,967)	
C	0,26 ± 0,03	0,05 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
	(p=0,001)		(p=0,634)	
PSLC	1,54 ± 0,21	1,10 ± 0,27	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	(p=0,015)		(p=0,967)	
P-Chl a	-0,70 ± 0,29	-1,24 ± 0,32	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
	(p=0,018)		(p=0,973)	
IA	2,24 ± 0,18	2,34 ± 0,11	-0,01 ± 0,01	-0,01 ± 0,00
	(p=0,366)		(p=0,991)	

Tabla 3.2. Coeficientes de regresión lineal, ordenada al origen y pendiente para los mesocosmos control y tratados con Roundup®, para la abundancia total algal (Ind. totales), la abundancia total de diatomeas (Diatomeas), el peso seco (PS), las cenizas (C), el peso seco libre de cenizas (PSLC), la concentración de clorofila a perifítica (P-Chl a) y el índice autotrófico (IA). Los niveles de significancia (p) entre tratamientos se encuentran entre paréntesis, y los significativos se resaltan en rojo. EE representa el error estándar.

En la Fig. 3.4 se puede observar la variación temporal del porcentaje acumulado promedio en densidad de los distintos grupos algales perifíticos que se

identificaron sobre los sustratos artificiales. Durante todo el experimento el perifiton en ambos tratamientos estuvo dominado por diatomeas, con un promedio general para todo el estudio de 82,48% ($\pm 24,61$ DE) en los mesocosmos control y de 60,89% ($\pm 33,59$ DE) en los tratados. Los rangos promedio para la cianobacterias variaron entre 4,93 y 12,22% y entre 15,36 y 31,24% y para las algas verdes oscilaron entre 5,06 y 12,82% y entre 6,88 y 21,72% en los mesocosmos control y con Roundup®. Se observó un incremento en el porcentaje de las cianobacterias desde la primera fecha de muestreo (8 días) en los mesocosmos tratados con respecto a los controles (Fig. 3.4).

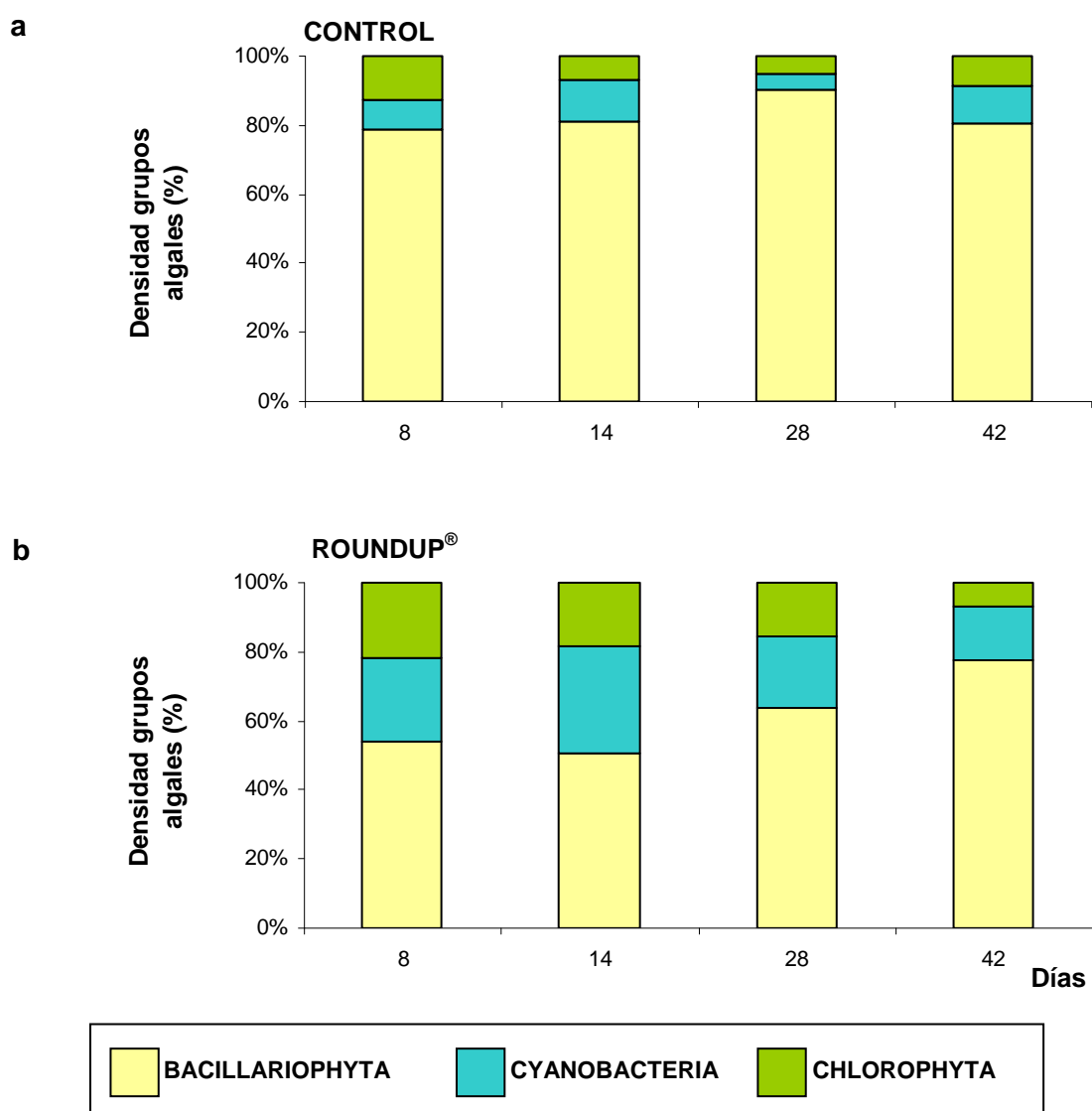


Fig. 3.4. Porcentajes acumulados promedio en abundancia de los grupos algales perifíticos en los mesocosmos **(a)** control y **(b)** tratados durante el experimento.

Las especies más representativas de diatomeas que se registraron fueron la ubicua *Gomphonema parvulum*, *Achnanthes minutissima* y *Amphora veneta*. Por su parte *G. parvulum* resultó la especie más abundante en ambos tratamientos a los 8 y 14 días de iniciada la experiencia aunque con valores de abundancia promedio menores (entre 35% y 80%) en los mesocosmos tratados que en los controles en todos los tiempos de muestreo. *A. veneta* presentó valores similares en la abundancia promedio en los dos tratamientos hasta los 28 días del experimento, registrándose un valor 150% mayor en los mesocosmos tratados con Roundup® con respecto a los controles, a los 42 días de iniciado el experimento. Se registró una abundancia promedio de *A. minutissima* 80% menor en los mesocosmos tratados con respecto a los controles a los 8 días de iniciada la colonización. Luego, se observó un progresivo aumento en el tratamiento con Roundup® hasta valores similares a los controles, desde los 28 días de iniciado el experimento, resultando ser la especie más abundante a partir de esta fecha en ambos tratamientos. Entre las cianobacterias, las especies más frecuentes registradas fueron *Chamaesiphon minutus*, *Chroococcus turgidus* y *Leptolyngbya faveolarum*. En los mesocosmos control, *C. minutus* fue la especie dominante hacia el final del estudio, en cambio en los mesocosmos con Roundup® no se registraron altas densidades para esta especie y *C. turgidis* resultó la dominante a los 42 días. Por último, las especies más representativas de Chlorophyta fueron *Stigeoclonium* sp. y *Pallmella mucosa*, aunque en todos los tiempos con densidades muy bajas con respecto a las diatomeas y cianobacterias.

El rango promedio de diatomeas muertas/diatomeas totales en porcentaje fluctuó entre 23,70 y 37,55% en los controles y entre 35,61 y 47,07% en los mesocosmos tratados. Se observó una gran mortalidad de diatomeas en las primeras etapas de colonización en los mesocosmos tratados (Fig. 3.5a) pero sin diferencias significativas entre los tratamientos. El rango de valores de la abundancia total de diatomeas (organismos vivos+muertos) a los 8 días de iniciado el experimento estuvo entre $3,04 \times 10^2$ a $1,99 \times 10^5$ individuos/cm² y de $4,44 \times 10^2$ a $1,12 \times 10^5$ indiv./cm² en los mesocosmos control y tratados, respectivamente (Fig. 3.5b). Desde ese día en adelante, la abundancia total de diatomeas se incrementó hasta el día 28 del experimento y luego se observó una pequeña disminución en la última fecha de muestreo. Comparando las rectas de regresión obtenidas a partir de las variaciones temporales de la abundancia de diatomeas, los mesocosmos tratados siempre mostraron valores significativamente menores en relación a los controles para el mismo tiempo (pendiente $p=0,815$; ordenada al origen $p=0,026$; Tabla 3.2).

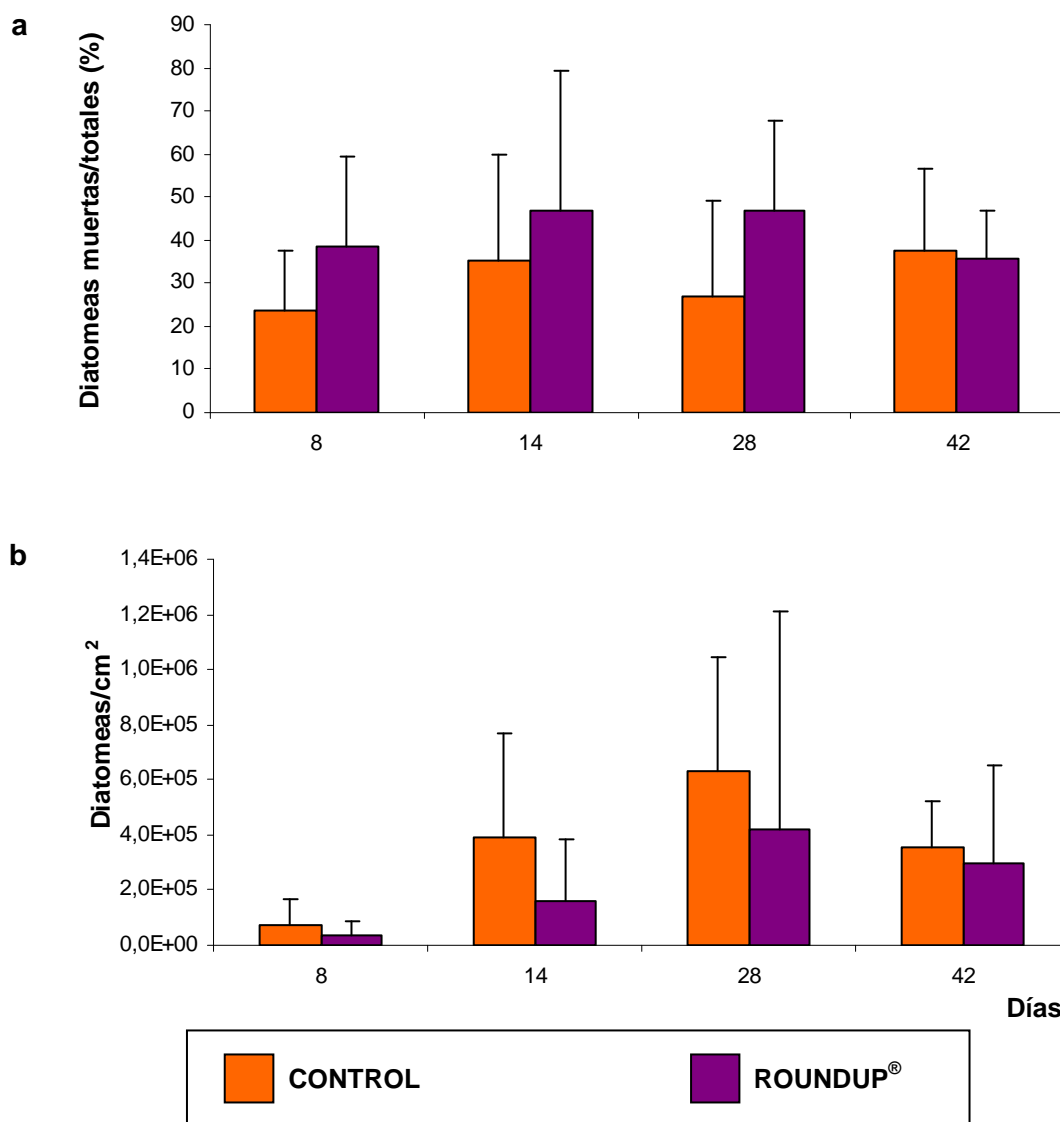
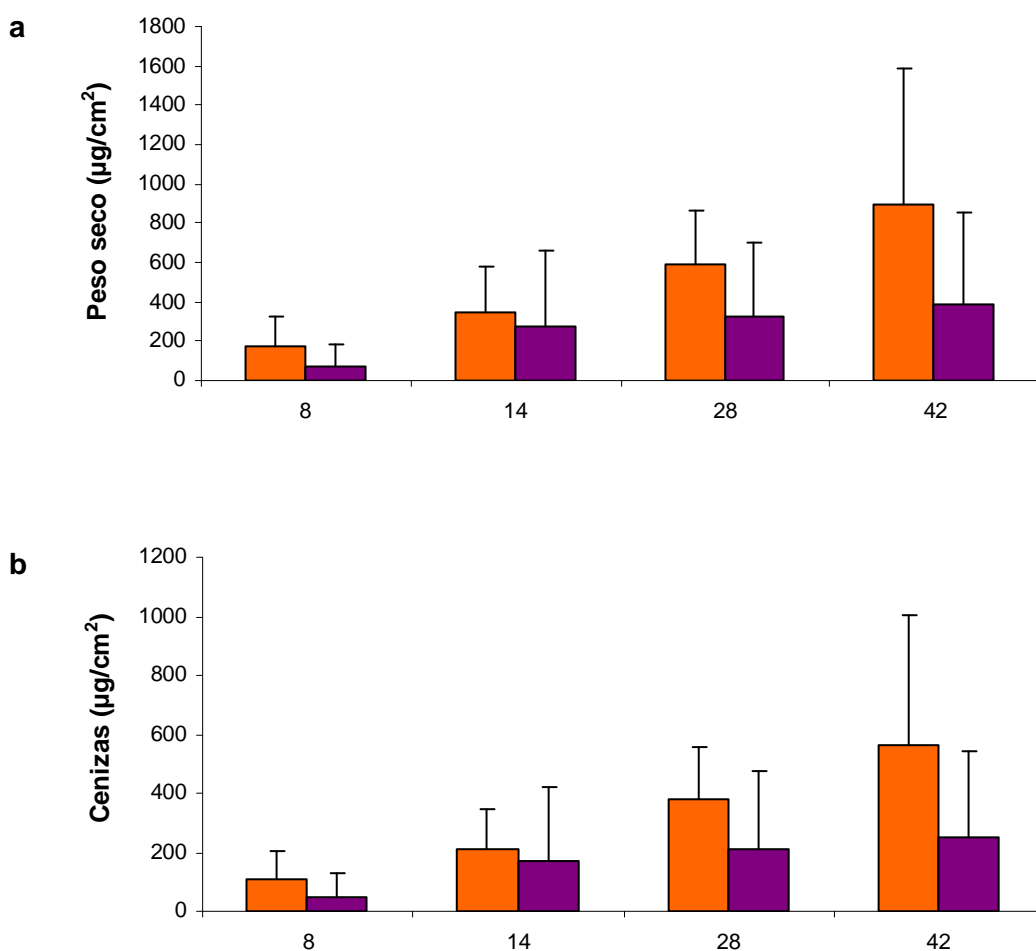


Fig. 3.5. (a) Porcentaje promedio de la relación diatomeas muertas/diatomeas totales, y **(b)** abundancia total de diatomeas, en los mesocosmos control y tratados a lo largo de la experiencia. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

El rango de peso seco promedio estuvo entre 173,94 a 893,41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y de 74,95 a 386,70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; las cenizas (C) promedio oscilaron entre 110,91 y 564,30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y entre 50,76 y 251,83 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, el PSLC medio estuvo entre los rangos de 63,03 a 329,11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y de 24,19 a 134,87 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y la concentración de P-Chl a, entre 0,42 y 4,90 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y entre 0,22 y 1,74 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, en los mesocosmos control y tratados, respectivamente, a lo largo del experimento. A pesar de la gran variación observada entre los mesocosmos en relación a las variables de masa perifíticas (PS, C, PSLC, P-Chl a), los valores de estos parámetros se incrementaron durante todo el experimento y fueron en todos los tiempos mayores en los mesocosmos control (Fig. 3.6a-d). Comparando las rectas de regresión obtenidas a partir de las variaciones

CAPÍTULO 3: Impacto en la colonización y sucesión del perifiton en mesocosmos

temporales del PS, de las C, del PSLC y de la P-Chl *a*, se observaron diferencias significativas entre los mesocosmos control y tratados. Los mesocosmos tratados siempre mostraron valores menores en relación a los controles en el mismo tiempo. Las rectas de regresión obtenidas mostraron dos líneas con valores similares de pendiente (PS $p=0,967$; C $p=0,634$, PSLC $p=0,967$; P-Chl *a* $p=0,973$) y diferencias significativas entre las ordenadas al origen (PS $p=0,002$; C $p=0,0007$, PSLC $p=0,015$; P-Chl *a* $p=0,018$) para todas las variables de masa (Tabla 3.2) lo que indica un retraso en la colonización del perifiton en los mesocosmos tratados en relación a los controles.



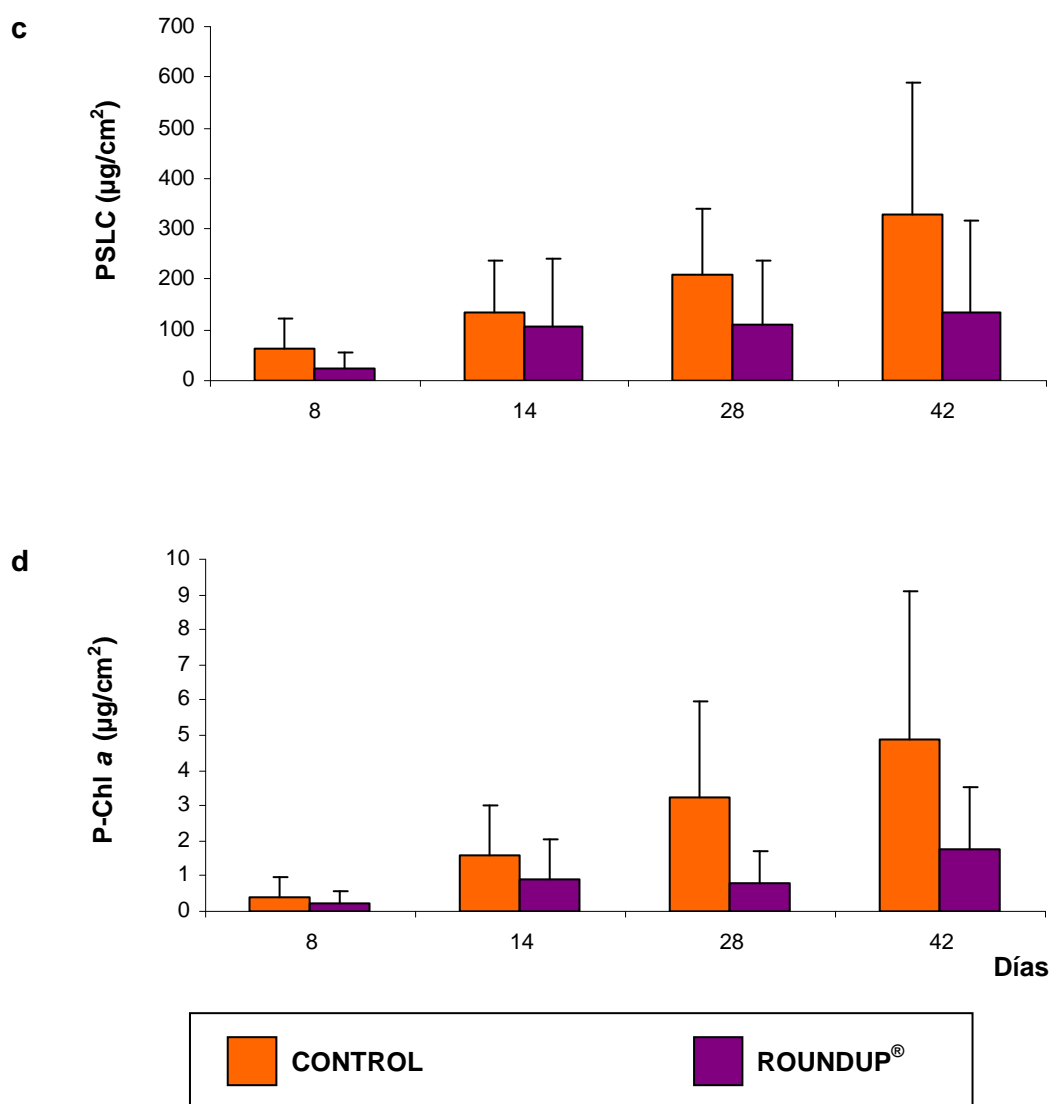


Fig. 3.6. Valores medios del (a) peso seco, (b) cenizas, (c) peso seco libre de cenizas (PSLC) y (d) concentración de clorofila a perifítica (P-Chl a), en los mesocosmos control y tratados con el herbicida Roundup® a lo largo de la experiencia. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

Se observaron para el índice autotrófico, valores similares entre los tratamientos en todas las fechas de muestreo, excepto a los 14 días de iniciado el experimento, cuando se registró un marcado aumento en los mesocosmos control (Fig. 3.7). Comparando las rectas de regresión obtenidas a partir de las variaciones temporales del IA, no se observaron diferencias significativas entre los mesocosmos control y tratados. Las rectas de regresión obtenidas mostraron dos líneas con valores similares de pendiente ($p=0,991$) y sin diferencias significativas entre las ordenadas al origen ($p=0,366$; Tabla 3.2).

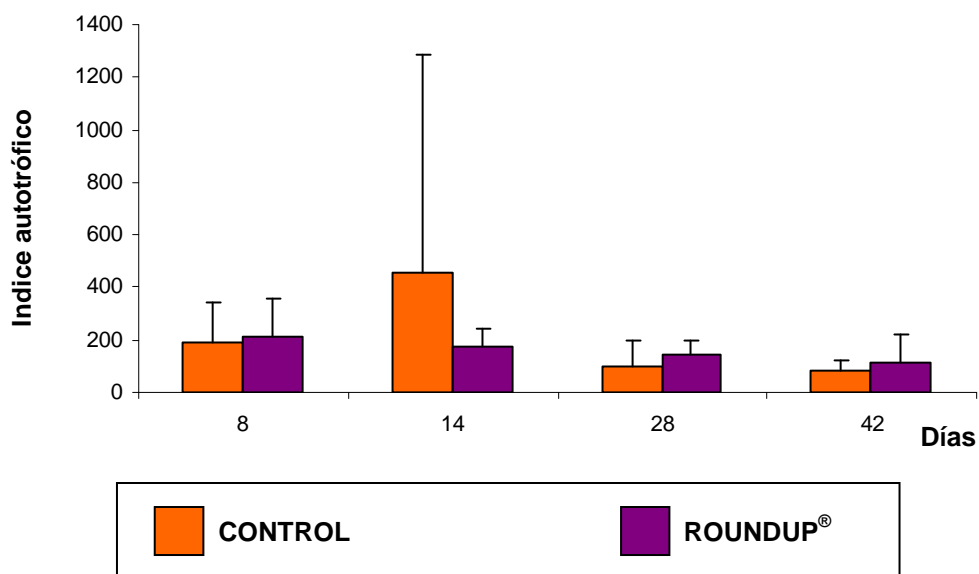


Fig. 3.7. Índice autotrófico (peso seco libre de cenizas/clorofila a perifítica) para los dos tratamientos. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

En la primer fecha de muestreo del perifiton, los valores de producción primaria perifítica (PP) estuvieron entre 0,22 y 30,18 mg C m⁻² h⁻¹ y entre 0,32 y 24,06 mg C m⁻² h⁻¹ en los mesocosmos control y tratados, respectivamente; una pequeña disminución se observó hacia el final del experimento (42 días). La PP mostró siempre valores medios mayores en los mesocosmos control (Fig. 3.8), pero sin diferencias significativas entre los tratamientos.

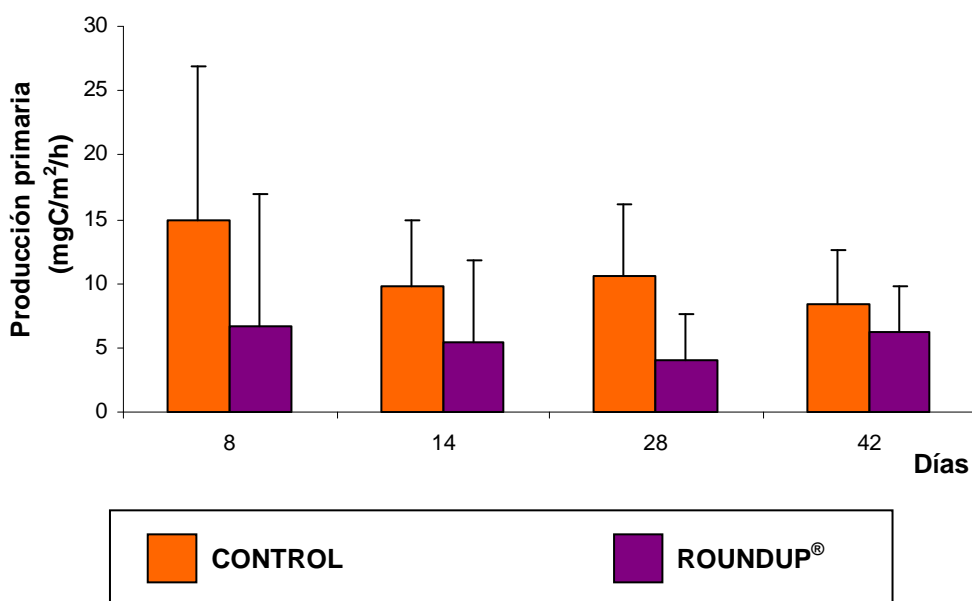


Fig. 3.8. Producción primaria perifítica media en los mesocosmos control y tratados con Roundup® a lo largo de la experiencia. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

Características del agua de los mesocosmos

Los diez mesocosmos mostraron una gran heterogeneidad en relación a las características limnológicas al inicio del experimento. Las características físicas y químicas antes de la adición del glifosato, al t0, se muestran en la Tabla 3.3.

Las concentraciones iónicas iniciales en los diferentes mesocosmos fueron bastante uniformes (Tabla 3.3). El agua era alcalina, con altos pH ($8,76 \pm 0,31$, media \pm DE) y conductividad ($2,72 \pm 0,07$ mS/cm), con el bicarbonato más el carbonato como los principales aniones y el sodio como el principal catión. La concentración promedio de oxígeno disuelto fue de $10,19 \pm 0,42$ mg/l. Las concentraciones de nitratos fueron altas (media 6,99 mg N/l), mostrando un gran rango de variación (1,82 – 12,38 mg N/l) y resultando ser significativamente mayor en los mesocosmos “claros” que en los “turbios” (KW $p=0,045$). El nitrito también resultó comparativamente alto ($238,77 \pm 106,94$ μ g/l), mayor que las concentraciones de amonio ($13,57 \pm 6,46$ μ g/l) pero sin diferencias significativas. Las concentraciones de FRS fueron comparativamente bajas ($7,20 \pm 3,31$ μ g/l) sin diferencias significativas entre los tratamientos, las concentraciones más bajas (3,80 – 4,60 μ g/l) fueron medidas en los mesocosmos con gran desarrollo de fitoplancton, y la más alta (15,20 μ g/l) en un mesocosmos con alta turbidez inorgánica (Tabla 3.3). Se registraron altas relaciones nitrógeno inorgánico/FRS, de alrededor de 1000. Las concentraciones de FT estuvieron en el rango entre 110 y 438 μ g/l; las concentraciones más altas en los mesocosmos “turbios” difirieron significativamente de los “claros” a partir de la segunda fecha de muestreo en adelante (KW $p=0,0001$).

	E1	E2	E3*	E4	E5	E6*	E7*	E8*	E9*	E10
pH	8,55	9,02	9,39	8,52	8,50	8,38	8,93	8,52	8,89	8,85
Conductividad (mS/cm)	2,57	2,72	2,78	2,73	2,79	2,77	2,73	2,61	2,75	2,77
Tn (NTU)	0,80	9,10	1,90	1,80	16,40	3,50	3,50	0,70	1,60	1,60
K_aPAR (m⁻¹)	**	1,77	4,26	0,89	4,11	0,70	**	1,66	2,26	6,37
Oxígeno disuelto (mg/l)	10,80	10,20	10,40	10,20	9,50	9,50	10,40	10,50	10,00	10,40
FT (µg/l)	153,00	153,00	241,00	131,00	219,00	131,00	110,00	142,00	197,00	438,00
FRS (µg/l)	6,40	7,60	3,80	7,60	15,20	9,00	7,60	6,40	4,60	3,80
N-NO₂ (µg/l)	203,00	431,80	340,50	106,70	279,40	193,10	66,10	289,60	223,50	254,00
N-NO₃ (mg/l)	11,29	2,33	1,82	9,83	2,33	8,37	11,65	12,38	6,92	2,98
N-NH₄ (µg/l)	11,80	16,50	15,40	9,50	8,30	14,20	8,30	26,00	4,70	21,00
CO₃ (mg/l)	62,15	95,62	152,99	43,03	52,59	47,81	95,62	47,81	100,40	95,62
HCO₃ (mg/l)	738,79	738,79	646,44	738,79	787,40	743,65	675,61	753,37	690,19	729,07
SO₄ (mg/l)	92,00	73,60	73,60	89,24	82,80	87,40	82,80	84,64	87,40	92,00
Cl (mg/l)	394,79	394,79	404,81	324,65	394,79	424,85	404,81	384,77	414,83	354,71
Ca (mg/l)	1,61	1,96	2,88	1,73	1,50	3,34	3,34	3,11	2,99	3,45
Mg (mg/l)	23,45	28,50	23,35	20,65	14,75	21,95	20,30	21,50	20,45	21,50
Na (mg/l)	520,00	615,00	545,00	515,00	440,00	630,00	620,00	590,00	630,00	615,00
K (mg/l)	25,00	22,00	23,50	20,50	24,00	24,00	22,00	22,50	25,00	24,50
Clorofila a fito (µg/l)	16,86	8,43	295,84	33,71	1,26	15,17	40,46	137,38	94,82	255,38
Aspecto general	macrófitas	inorgánico	orgánico (fitoplancton)	macrófitas + metafiton	inorgánico	inorgánico + orgánico (fitoplancton)	macrófitas + metafiton	macrófitas	orgánico (fitoplancton)	orgánico (fitoplancton)
Estado	claro	turbio	turbio	claro	turbio	turbio	claro	claro	turbio	turbio

Tabla 3.3. Aspecto general, estado y variables físicas y químicas del agua de los mesocosmos (E) antes de la adición del glifosato (t0). * representa mesocosmos a los que se le adicionó Roundup® y ** que no existen datos.

Los valores iniciales de clorofila a fitoplanctónica estuvieron en el rango desde 1,26 a 295,84 µg/l. Las concentraciones de Chl a mostraron una significativa variación entre los mesocosmos a lo largo del experimento, independientemente de la adición del glifosato. Estas variaciones se mantuvieron durante casi todo el experimento sin registrarse diferencias significativas entre los tratamientos.

La composición iónica no mostró diferencias significativas entre los tratamientos en todo el experimento. El sodio fluctuó entre 380 y 1090 mg/l mientras que el bicarbonato fluctuó entre 510,35 y 956,48 mg/l sin diferencias significativas entre los tratamientos. El rango del pH del agua estuvo entre 8,18 y 9,64 y el oxígeno disuelto entre 5,70 y 11,50 mg/l. La temperatura media del agua al t5 fue de 9,33°C en E1 y 9,77°C en E3.

Los rangos de FT estuvieron entre 88 y 460 µg/l en los mesocosmos control y entre 131 y 1110 µg/l en los mesocosmos inoculados con Roundup®, mostrando diferencias significativas entre ellos (KW $p=0,00003$). El FT se incrementó significativamente en el agua de los mesocosmos luego de la adición de Roundup®, con una tendencia a disminuir posteriormente (Fig. 3.9). La disipación del FT mostró una tendencia lineal significativa ($\ln FT = 6,9 - 0,04 \text{ día}$; $p=0,0002$) a partir del tercer día de la aplicación del glifosato. Luego de 42 días de la adición del herbicida no se observaron diferencias significativas en la concentración de FT entre los mesocosmos con y sin adición de Roundup®.

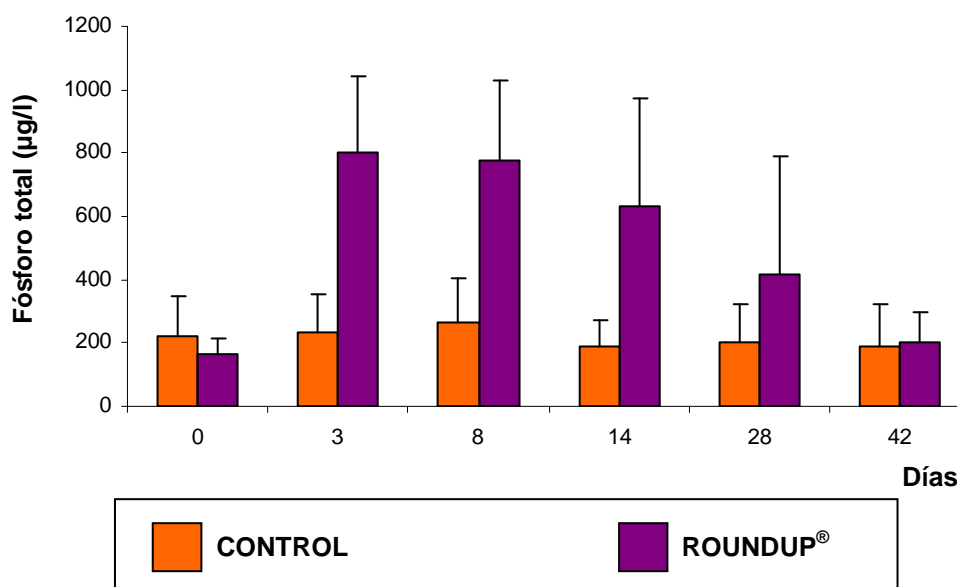


Fig. 3.9. Concentración promedio de fósforo total en los mesocosmos control y tratados a lo largo del experimento. Las barras de error representan +1 desvío estándar.

Los restantes nutrientes medidos, amonio, nitrato, nitrito y FRS, variaron durante el experimento sin mostrar un patrón discernible. Las concentraciones de nitrato se mantuvieron más altas en los mesocosmos “claros” que en los “turbios”. El FRS se incrementó desde la primer a la segunda fecha de muestreo y luego se mantuvo alto en ambos tratamientos. Este comportamiento se debió probablemente a la liberación de fosfato de los sedimentos luego de la mezcla del agua de los mesocosmos controles y tratados al t_0 , realizada para la homogeneización del glifosato en los mesocosmos tratados y a fin de repetir la misma acción mecánica en los controles. No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos para estos nutrientes.

El $K_d(\text{PAR})$ no varió significativamente entre tratamientos, promediando $4,28 \text{ m}^{-1}$ ($\pm 3,37 \text{ DE}$), con un rango entre $0,56$ y $16,00 \text{ m}^{-1}$. La turbidez nefelométrica (T_n) no varió significativamente entre tratamientos, y el valor promedio para todo el estudio fue $5,59 \text{ NTU}$ ($\pm 5,70 \text{ DE}$), con un rango entre $0,50$ y $24,60 \text{ NTU}$.

Evolución del glifosato

Las concentraciones de glifosato se ajustaron a una función logarítmica asumiendo una cinética de primer orden ($\ln \text{ glifo} = -0,165 \text{ día} + 1,8$; $p=0,000001$) (Fig. 3.10), y se obtuvieron una tasa de disipación estimada (k) de $0,165 \text{ día}^{-1}$ ($\pm 0,022 \text{ error estándar, EE}$) y una vida media de $4,2$ días en los mesocosmos tratados. Las concentraciones de glifosato sólo 1 hora después de la aplicación del herbicida fueron similares entre los mesocosmos, presentando un valor medio de $8,46 \text{ mg/l}$ ($\pm 0,69 \text{ DE}$). Uno de los cinco mesocosmos tratados (E3) fue excluido del análisis de disipación debido a su errático comportamiento en la concentración del glifosato a lo largo del experimento.

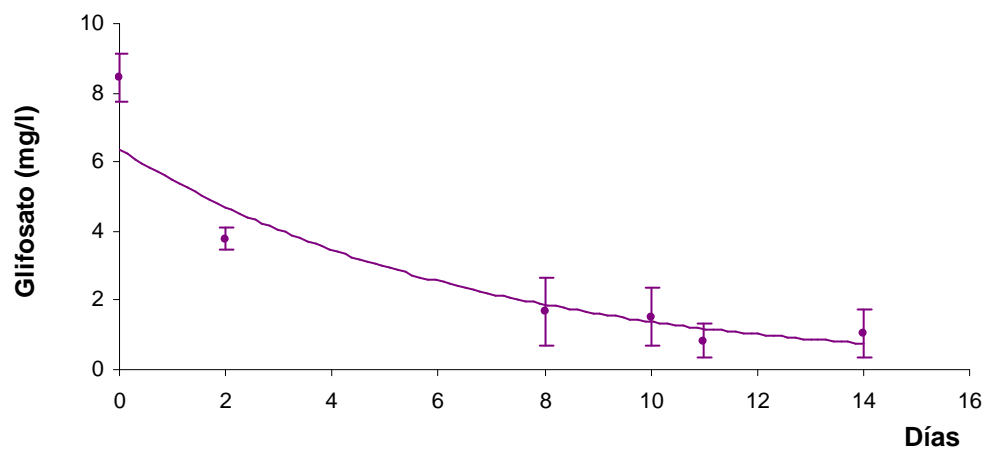


Fig. 3.10. Disipación del glifosato del agua de los mesocosmos tratados con Roundup® (n=4). Las barras de error representan ± 1 desvío estándar.

DISCUSIÓN

El Roundup® afectó negativamente el proceso de colonización y sucesión del perifiton mostrándose un claro retraso en la colonización perifítica de los sustratos atribuido al efecto toxicológico directo del Roundup® y que se pudo observar hasta el final del experimento, 42 días. Considerando que el perifiton es una de las comunidades microbianas más significativas en la base de las tramas tróficas en lagunas someras (Vadeboncoeur y Steinman 2002), las consecuencias en la ecología del sistema pueden ser importantes ya que las alteraciones que pueda sufrir la comunidad se extenderán a toda la trama trófica. A pesar de que ambos tratamientos, con y sin herbicida, exhibieron un incremento de biomasa, en los mesocosmos control la magnitud de la acumulación de biomasa fue mayor que en aquellos que recibieron Roundup®, y este efecto fue evidente hasta el final del experimento. Austin *et al.* (1991) registraron un comportamiento opuesto con un aumento del PSLC y de las densidades algales como resultado de la adición de glifosato (mediante el formulado Vision®). Estos autores demostraron el aumento de la concentración de fósforo soluble como resultado de la degradación del glifosato en arroyos oligotróficos. Por tanto, los productores primarios perifíticos pudieron desarrollar mayor biomasa en tales ambientes pobres en nutrientes. Nuestros mesocosmos fueron siempre eutróficos y las diferencias en crecimiento pueden ser atribuidas al efecto toxicológico directo del Roundup®.

A pesar de la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos, la tendencia a disminuir de la producción primaria en los mesocosmos tratados fue clara y consistente con los resultados reportados por Goldsborough y Brown (1988). Estos autores encontraron que la actividad fotosintética del perifiton decrecía con el incremento en la cantidad de herbicida, y que la concentración limitante para este efecto depende de las propiedades físicas y químicas de los cuerpos de agua y de otros factores, incluyendo la limitación de transporte en los densos “biofilms” perifíticos y la degradación del herbicida por los organismos perifíticos como fuente de fósforo. Consistentemente, en nuestro experimento, el mayor efecto puede ser visto a 8 días de la colonización, cuando los “biofilms” perifíticos eran delgados y la cantidad de material no algal era la más baja. Es importante resaltar que la toxicidad está producida por el efecto conjunto del glifosato y el POEA, que es el surfactante del formulado comercial Roundup® cuya toxicidad ha sido demostrada como mayor a la del glifosato (Cedergreen y Streibig 2005, Struger *et al.* 2008).

Entre los grupos algales principales, las diatomeas parecen ser las más afectadas por el herbicida, con las abundancias más bajas en los mesocosmos tratados. Teniendo en consideración el mayor número de diatomeas muertas inmersas

en la matriz perifítica en los mesocosmos tratados con Roundup® que en los controles, es claro que el herbicida produjo la mortalidad y la disminución en el reclutamiento de nuevos organismos. Este incremento en el número de frústulos vacíos también fue observado en el primer experimento (Capítulo 1) aunque sin diferencias significativas entre los tratamientos. Una de las especies más abundantes de diatomeas, *Achnantes minutissima*, es considerada una especie altamente sensible a la contaminación orgánica (Lange-Bertalot 1979 en Gómez 1998, Steinberg y Schiefele 1988 en Kwadrans *et al.* 1998), lo que podría explicar la baja densidad al inicio del estudio. El aumento progresivo de la abundancia de esta especie hasta valores similares a los controles podría estar indicando un mejoramiento en la calidad del agua de los mesocosmos (Kwadrans *et al.* 1998) y una recuperación de la especie al disminuir la concentración del herbicida. Así también, Sáenz y Di Marzio (2009) han demostrado la recuperación del crecimiento exponencial de cuatro algas clorófitas dulceacuícolas al cabo de 10 días de exposición al glifosato, en forma de principio activo y el formulado Roundup®. Por otra parte, la mayor abundancia de *Gomphonema parvulum* y los valores similares a los controles de *Amphora veneta* en los mesocosmos tratados al inicio del estudio, cuando se registran las mayores concentraciones del herbicida en el agua, concuerdan con la tolerancia a la contaminación orgánica que se les adjudica a estas dos especies de diatomeas (Lange-Bertalot 1979 en Gómez 1998).

En este caso, como en el estudio previo (Capítulo 1), se registró un mayor porcentaje relativo de cianobacterias perifíticas en los mesocosmos con adición de Roundup® con respecto a los controles, hecho que aporta nuevamente evidencias sobre la tolerancia al glifosato de estos organismos, capaces de soportar ambientes extremos, que se ha mencionado en el Capítulo 1.

Un importante resultado de este estudio es que, independientemente del tipo limnológico del cuerpo de agua, el contenido de fósforo del glifosato adicionado causó el incremento en el FT en todos los mesocosmos tratados. Este fenómeno también fue reportado en el experimento detallado en el Capítulo 1, donde se registró un incremento del FT luego de la adición de Roundup®, pero en mesocosmos con similares propiedades limnológicas. Considerando que el fósforo representa el 14% del peso molecular del glifosato, la adición de 8 mg/l de glifosato contribuyen con 1120 µg F/l. Por lo tanto, siendo esta concentración mayor a la registrada al t1, el incremento medido en el FT en la primera muestra estaría explicado por el agregado de glifosato al agua. Teniendo en cuenta que el glifosato se disipa rápidamente del agua -nosotros registramos una vida media de 4,2 días similar a aquella reportada en la literatura-, tres procesos pudieron ocurrir simultáneamente: la incorporación del herbicida en las macrófitas y los microorganismos como el fitoplancton y el perifiton; la degradación del

glifosato por bacterias y hongos (Castro *et al.* 2007, Liu *et al.* 1991), y su inmovilización mediante el contacto con los sedimentos, suelos y minerales constituyentes de la arcilla, por la formación de complejos superficiales con iones metálicos (Pessagno *et al.* 2005). En los suelos, la ruta metabólica más importante del glifosato es la degradación a ácido aminometilfosfónico (AMPA) el que luego es metabolizado a dióxido de carbono (Giesy *et al.* 2000). La degradación microbiana de AMPA ha sido reportada como que procede a una tasa más lenta que la descomposición del glifosato, siendo detectado en las muestras mucho más frecuentemente que el glifosato (Kolpin *et al.* 2006). Ya que el AMPA contiene el grupo fosfato del glifosato, y considerando que nosotros medimos una tasa de disipación de glifosato cuatro veces más rápida que la tasa de disipación del FT, sugerimos que la ruta metabólica de degradación del glifosato es cuantitativamente mayor en nuestro experimento. Sin embargo, el glifosato adsorbido a las partículas tiene una vida media mayor y retornará al agua en la medida que las reacciones de equilibrio se modifiquen lentamente (Barja y dos Santos Afonso 2005) provocando un eventual efecto a largo plazo.

Los ecosistemas acuáticos de los alrededores de la región Pampeana -más de 10000 cuerpos de agua (Dukatz *et al.* 2006)- están en riesgo de ser afectados por las propiedades toxicológicas como así también por el potencial de eutroficación del glifosato. En nuestro estudio hemos podido comprobar que el glifosato afecta significativamente la posibilidad de colonización de nuevos sustratos por parte del perifiton lo que le altera la posibilidad de extenderse hacia otros hábitats ante la presencia del agrotóxico. Sabiendo que el perifiton interactúa con otras comunidades y con el ambiente abiótico, se puede inferir que se verán alterados la estructura y el funcionamiento de los sistemas acuáticos naturales. Basándonos en nuestros resultados como así también en aquéllos obtenidos en estudios previos, es claro que las prácticas agrícolas que involucran el uso de herbicidas, como el Roundup[®], afectan organismos no blanco y la calidad del agua, modificando la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas dulceacuícolas.

CAPÍTULO 4

IMPACTO DEL HERBICIDA GLIFOSATO ATANOR[®] SOBRE COMUNIDADES MICROBIANAS DE AGUA DULCE: EXPERIMENTO EN MICROCOSMOS

INTRODUCCIÓN

Para los ecólogos siempre ha sido un desafío entender y predecir los impactos que tienen los contaminantes sobre las comunidades naturales. En los ecosistemas acuáticos, los pesticidas son un tipo de contaminante muy común de encontrar, por lo cual existe un creciente esfuerzo para determinar la gran cantidad de efectos potenciales, tanto directos como indirectos, por los que los organismos acuáticos pueden ser afectados cuando se encuentran embebidos en una comunidad natural (Relyea y Hoverman 2006).

Los experimentos en ecosistemas artificiales experimentales suelen ser una herramienta muy útil, simple, controlable y con posibilidades de replicación para estudiar los efectos de los pesticidas sobre comunidades acuáticas. Particularmente, las dimensiones físicas de los microcosmos al aire libre nos permiten simular cuerpos de agua reducidos y/o temporarios, tan ampliamente distribuidos en el mundo en general y nuestro país en particular. Por ejemplo, los podemos encontrar luego de una lluvia esparcidos en terrenos bajos, al costado de los caminos o dentro de áreas de cultivo. Estos sistemas dulceacuícolas son considerados sitios de gran relevancia ecológica por ser importantes fuentes de biodiversidad al ser periódicamente disturbados y son primordiales como hábitat, sitio de cría y fuente de agua para gran cantidad de organismos (García y Niell 1993, Wiggins *et al.* 1980, Williams 1985). Debido a su pequeño tamaño, la adición de una mínima cantidad de un pesticida como el glifosato, ya sea de manera directa o indirecta, puede afectar en forma drástica la estructura y funcionamiento de las comunidades y del ecosistema en su totalidad.

Es importante intensificar los estudios científicos sobre el impacto que el herbicida glifosato tiene en los ecosistemas acuáticos, pero mucho más significativo es estudiar los potenciales efectos de los distintos formulados de glifosato, ya que son los que realmente son utilizados por los agricultores a la hora de aplicar el herbicida en el campo. Por esta razón, el **objetivo general** del experimento factorial que se detalla a continuación es evaluar el efecto del Glifosato Atanor[®], un formulado de glifosato comúnmente utilizado en la Argentina sobre el perifiton en interacción con el fitoplancton, bacterioplancton y zooplancton, y con el medio abiótico, a través de un ensayo manipulativo en microcosmos al aire libre. Hemos focalizado el experimento en reducir la escala espacial y analizar los efectos de un formulado de glifosato sobre la calidad del agua de reservorios de tamaño reducido, simulando los cuerpos de agua temporarios que se encuentran en las cercanías de los campos de cultivo. El análisis de múltiples variables, tanto ambientales como biológicas, puede dar un panorama más realista y extrapolable de los posibles efectos de los contaminantes en este tipo de ambientes acuáticos.

Los **objetivos específicos** que se plantean involucran el estudio comparativo con y sin agregado de Glifosato Atanor[®]. Son los siguientes:

- (1) Realizar estudios taxonómicos y cuantitativos de la fracción algal de la comunidad perifítica desarrollada sobre sustratos artificiales.
- (2) Analizar las distintas fracciones de masa perifítica sobre sustratos artificiales por evaluación de peso seco, cenizas, peso seco libre de cenizas, concentración de clorofila a y pigmentos accesorios.
- (3) Estudiar algunos procesos fisiológicos, viabilidad algal e índice de estrés oxidativo del perifiton.
- (4) Analizar cuali- y cuantitativamente a la comunidad del micro y nanofitoplancton (fracción >2 µm) y analizar cuantitativamente al picoplancton, tanto autotrófico como heterotrófico.
- (5) Examinar la presencia y abundancia de los principales grupos del zooplancton.
- (6) Estudiar las variables físico-químicas del agua mediante la medición *in situ* y análisis en laboratorio.

Hipótesis

Dado que las algas poseen la ruta metabólica del ácido shikímico que se ve afectada por el mecanismo principal de acción del glifosato,:

H1: en los microcosmos tratados con el herbicida se registrará una mayor mortalidad algal con respecto a los microcosmos control.

H2: la presencia del herbicida en el agua provocará la disminución tanto de la biomasa algal perifítica como de la densidad del micro- y nanofitoplancton.

Además de su modo de acción principal, el glifosato perjudica estructuras celulares y otros procesos bioquímicos, entonces:

H3: el herbicida provocará daños en las algas perifíticas induciendo estrés oxidativo y afectando su viabilidad.

Las cianobacterias poseen mecanismos que les permiten tolerar el glifosato, por lo que:

H4: como respuesta al agregado del formulado se incrementará la proporción de cianobacterias, tanto perifíticas como planctónicas.

Las bacterias son los principales microorganismos que degradan la molécula de glifosato, por lo tanto podría esperarse:

H5: un aumento en la densidad de bacterioplancton en los microcosmos con Glifosato Atanor[®].

Podemos esperar un efecto del formulado sobre el zooplancton, el que podrá ser directo o indirecto. De acuerdo a la información disponible sobre el efecto de formulados de glifosato sobre el zooplancton, esperaremos que:

H6: exista una disminución de su densidad por efecto directo del formulado y alteración de su estructura.

H7: si el herbicida produce un efecto sobre los productores primarios, por transmisión hacia el nivel trófico superior, exista un efecto indirecto sobre el zooplancton.

Considerando que el fósforo forma parte de la molécula de glifosato, se estima que:

H8: la concentración de fósforo total en el agua se incrementará a partir del agregado del herbicida conduciendo al deterioro de la calidad del agua del sistema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del cuerpo de agua artificial

Tres meses antes del comienzo del experimento factorial, un tanque cilíndrico de aproximadamente 1 metro de profundidad y 2 metros de diámetro, con capacidad para ~3000 litros, ubicado en el predio del INTECH en Chascomús, se llenó con agua de red (Fig. 4.1). Se le agregaron plantas acuáticas de fondo no arraigadas (*Ceratophyllum* sp.) obtenidas de la laguna cercana “El Triunfo” y se lo dejó evolucionar hasta febrero del año 2009 para obtener un cuerpo de agua con características bióticas y abióticas semejantes a las de cuerpos de agua someros de la región. El mantenimiento del tanque durante el tiempo previo a la experiencia se realizó con la colaboración de Roberto Escaray y José Bustingorry del INTECH.



Fig. 4.1. Tanque experimental utilizado para la experiencia. En la foto de la derecha se observan los perifitómetros instalados para la colonización de los sustratos artificiales.

Diseño experimental

El experimento factorial tuvo lugar entre el 12 de febrero y el 5 de marzo de 2009 en 6 microcosmos al aire libre construidos dentro del tanque cilíndrico antes mencionado (Fig. 4.2).

El día del comienzo del experimento, se instalaron seis bolsas de polietileno de alta densidad (microcosmos) de 60 cm de profundidad y 45 cm de diámetro aproximadamente (con capacidad para ~90 litros) sostenidas por estructuras de policarbonato transparente y suspendidas dentro del tanque de mayor capacidad

mediante un dispositivo de flotación (Fig. 4.2). Cada uno de los microcosmos se llenó con el agua del tanque mayor y se les asignó al azar un perifitómetro con sustratos artificiales previamente colonizados en el tanque con la comunidad perifítica (ver más abajo) (Fig. 4.2).

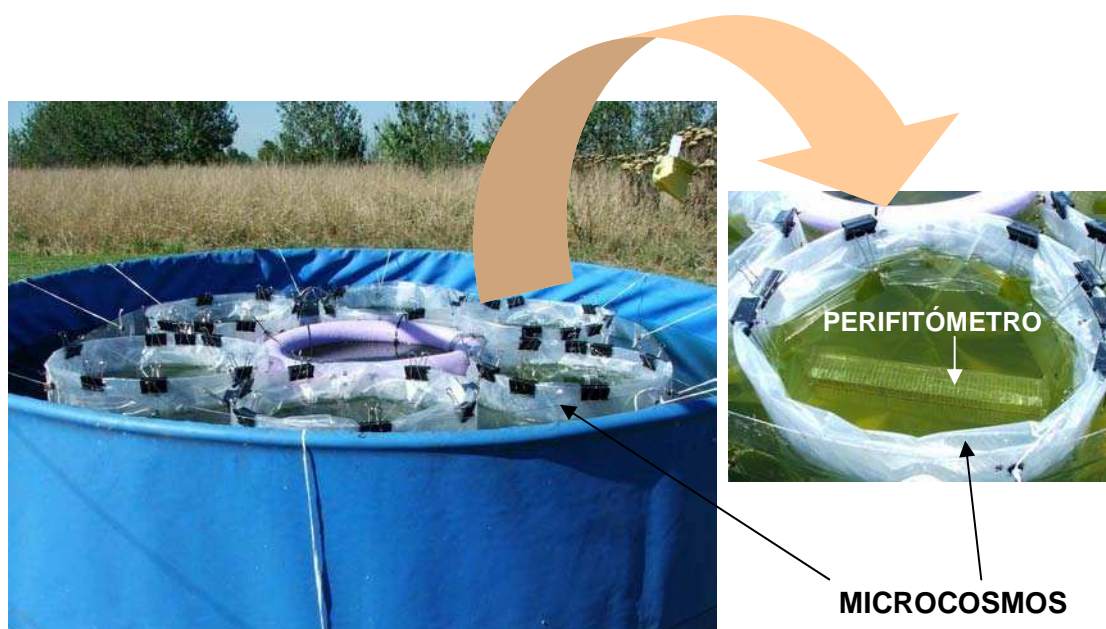


Fig. 4.2. Microcosmos instalados dentro del tanque, cada uno con un perifitómetro en su interior.

Se ensayaron dos tratamientos, con 3 réplicas cada uno, asignados al azar a los microcosmos: control (sin adición de glifosato) y tratamiento con Glifosato Atanor[®] (formulado de glifosato, sal de glifosato al 48% p/v) a una concentración de 3,5 mg de glifosato/litro. Esta concentración fue elegida por ser similar a la recomendada para el control de las malezas acuáticas y terrestres (3,7 mg i.a./L, Giesy *et al.* 2000) y a la concentración máxima ambiental esperada de glifosato para un cuerpo de agua de 15 cm de profundidad (3,8 mg i.a./litro; Perkins *et al.* 2000, Peterson *et al.* 1994). Por otro lado, también se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos sobre la microbiota acuática en los dos experimentos anteriores y, en este caso, se decidió utilizar una concentración de glifosato menor para estudiar qué efectos tiene el herbicida sobre los organismos acuáticos a concentraciones menores en cuerpos de agua de menor tamaño.

Se realizaron cinco muestreos a distintos intervalos de tiempo. El primero (t₀) se llevó a cabo momentos antes de la aplicación del herbicida. Los restantes fueron realizados 1, 7, 14 y 21 días (t₁ a t₄, respectivamente) posteriores a la aplicación del

glifosato. En cada fecha de muestreo se tomaron muestras de agua y de las distintas comunidades a estudiar de cada uno de los microcosmos. Todas las muestras fueron llevadas inmediatamente en oscuridad al laboratorio para su posterior análisis.

Variables biológicas

Perifiton

El estudio de la comunidad perifítica se llevó a cabo sobre perifiton desarrollado sobre sustratos artificiales (policarbonato transparente) a partir de un valor máximo de biomasa obtenido por incubación previa. Por lo tanto, 21 días antes del comienzo del experimento se dispusieron los sustratos para la incubación en 6 soportes de acrílico transparente (perifitómetros) suspendidos dentro del tanque (Fig. 4.2). Ver página 64 del Capítulo 3 para una explicación más detallada del diseño de los perifitómetros y los sustratos artificiales.

En cada fecha de muestreo se extrajo de cada uno de los microcosmos una cantidad determinada de sustratos colonizados que fueron transportados en oscuridad al laboratorio para su posterior procesamiento. El perifiton desarrollado en los sustratos fue removido raspando la superficie de los mismos y el material obtenido fue diluido en agua destilada y llevado a los distintos frascos de PVC para los análisis posteriores. Todas las variables perifíticas se expresaron por unidad de área (APHA 2005).

Las muestras para las determinaciones algales cualitativas fueron fijadas con formaldehído al 2%. En el laboratorio se procedió a la identificación taxonómica de los componentes algales de la comunidad perifítica bajo microscopio óptico, equipado con cámara clara, a un aumento de 1000x, utilizando bibliografía de la especialidad (página 32 del Capítulo 1). La identificación de las algas perifíticas se llevó a cabo bajo la supervisión del Dr. Tell en el Laboratorio de Limnología de la FCEyN, UBA.

Las muestras para análisis cuantitativo del perifiton se fijaron con lugol acético a una concentración final del 1%. Los recuentos de las algas del perifiton se llevaron a cabo en microscopio invertido (Utermöhl 1958) a un aumento de 400x. El error de los recuentos (<15%) fue estimado según Venrick (1978). Se determinaron la densidad total y por especie y la mortalidad algal del perifiton considerando como individuos muertos aquéllos con visibles signos de deterioro al microscopio, como rotura de pared o presencia de cloroplasto desorganizado. En el caso de las diatomeas se consideró al individuo muerto si presentaba los frústulos vacíos, rotos o separados. Para los filamentos se estableció el criterio a partir del cual los individuos fueron considerados como unidad de la siguiente manera: para las cianobacterias se consideró un individuo

a los filamentos de 20 µm de longitud, para las Zygnematales se establecieron 5 células, para las Oedogoniales de gran tamaño, 3 células y para las de menor calibre, 7 células.

Las distintas fracciones de masa del perifiton (PS, C y PSLC) se estimaron de la misma manera que fue descrita en la página 32 del Capítulo 1. Se calculó también el índice autotrófico (Capítulo 1, página 32).

Se determinaron las concentraciones de clorofila *a* y *b* y de carotenos del perifiton siguiendo la metodología descrita por Lichtenthaler (1987). Para esto, se obtuvo por separado, el perifiton de 3 sustratos de cada microcosmos mediante raspado y centrifugado (10 min, 3.000 x g). Las células se rompieron (resuspendieron, homogeneizaron) en acetona 80% v/v mediante sonicación utilizando un Sonicador Cole Parmer CP600 4710. Luego de 1 hora de incubación en oscuridad a 4°C, los extractos fueron clarificados por centrifugación durante 10 min a 3.000 x g y se leyó la absorbancia a 663,2; 646,8 y 470 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/visible. El contenido de clorofilas *a* y *b* y total (*a+b*) y de carotenos totales se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/ml de extracto)} = (12,25 \times \text{Abs}^{663,2}) - (2,79 \times \text{Abs}^{646,8})$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g/ml de extracto)} = (21,5 \times \text{Abs}^{646,8}) - (5,1 \times \text{Abs}^{663,2})$$

$$\text{Clorofila } a+b \text{ (}\mu\text{g/ml de extracto)} = (7,15 \times \text{Abs}^{663,2}) + (18,71 \times \text{Abs}^{646,8})$$

$$\text{Carotenos totales (}\mu\text{g/ml de extracto)} = [(1000 \times \text{Abs}^{470}) - (1,82 \times \text{Chl } a) - (85,02 \times \text{Chl } b)]/198$$

Se calculó el contenido de clorofila en la comunidad teniendo en cuenta la superficie de sustrato raspada, y los resultados se expresaron como µg de clorofila/cm².

Se analizó la viabilidad en células del perifiton, estimando la actividad metabólica mitocondrial mediante una técnica espectrofotométrica basada en la reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) a azul de formazán por acción del NADH producido por células metabólicamente activas (Markelova *et al.* 2000). Para realizar este ensayo, las células fueron obtenidas por raspado y centrifugación a 3.000 x g durante 20 minutos, y luego fueron lavadas y resuspendidas en un buffer de fosfato de potasio 0,134 M (pH 6,5). A fin de iniciar el ensayo, se agregaron 100 µl de solución de MTT (0,14 mg/ml) a 250 µl de muestra, y se incubó a 25°C durante 1 hora. Luego de la incubación se procedió a la centrifugación a 2.000 x g durante 10 minutos, el sobrenadante fue removido y se agregó 1 ml de DMSO a fin de disolver los cristales de formazán producidos. Se midió

la absorbancia del producto formazán por espectrofotometría a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/visible. Los resultados fueron expresados como actividad específica de la reducción de MTT (Abs540/mg PSLC).

Se determinó el daño a lípidos como parámetro de estrés oxidativo (EO). Las células se obtuvieron por raspado y centrifugación a 3.000 x g por 20 minutos, lavadas con buffer fosfato de potasio 0,134 M (pH 6,5) y resuspendidas en el mismo buffer conteniendo inhibidores de proteasas (0,2 mM de benzamidina y 0,5 mM de fenil-metil-sulfonil fluoruro). Las células se rompieron por sonicación en un homogeneizador ultrasónico Cole Parmer CP600 4710, aplicando pulsos de 15 segundos. El homogenato obtenido fue centrifugado a 11.000 x g por 30 minutos y el sobrenadante fue utilizado como extracto enzimático y fuente de peróxidos de lípidos. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C. El daño a lípidos se estimó a partir de los niveles celulares de malondialdehído (MDA, producto final mayoritario de la peroxidación lipídica), mediante el dosaje de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Vavilin *et al.* 1998). La técnica se basa en la reacción colorimétrica entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el MDA, para dar un compuesto de color rosa con un pico de absorción a 535 nm. Una alícuota de 175 µl del sobrenadante centrifugado a 11.000 x g se resuspendió con 1 ml de reactivo conteniendo TBA y se incubó por 30 minutos en baño de agua a 100° C. La lectura de la absorbancia del sobrenadante clarificado fue medida a 535 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV/visible. El contenido de TBARS fue estimado como equivalentes de MDA, usando un coeficiente de extinción molar de 156 mM⁻¹ cm⁻¹. Los resultados fueron expresados como nanomoles de MDA por gramo de peso seco libre de cenizas.

Para la determinación de la concentración de pigmentos y los estudios de viabilidad celular y estrés oxidativo se contó con la colaboración de las Dras. Ríos de Molina y Juárez y la Lic. Iummato, en el laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo del Departamento de Química Biológica de la FCEyN, UBA.

Fitoplancton y bacterioplancton

Se cuantificaron las diferentes fracciones de tamaño del fitoplancton y el bacterioplancton a partir de muestras tomadas directamente de cada microcosmos y colocadas en frascos de PVC.

Las muestras para análisis cualitativo del micro- (>20 µm) y nanofitoplancton (2-20 µm) se fijaron con formaldehído al 2% y aquéllas para análisis cuantitativo fueron fijadas con lugol acético a una concentración final del 1%. En el laboratorio se procedió a la identificación taxonómica de los componentes de la comunidad fitoplanctónica bajo microscopio óptico equipado con cámara clara, utilizando bibliografía de la

especialidad. Los recuentos de estas fracciones se llevaron a cabo a 400x utilizando microscopio invertido siguiendo la metodología descrita por Utermöhl (1958). El error (máximo del 15%) de los recuentos fue estimado según Venrick (1978).

Las muestras de picofitoplancton (0,2-2 μm) y bacterioplancton fueron preservadas en glutaraldehído frío al 2%. Para el recuento de la fracción picoplanctónica se aprovechó la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos (Caron 1983, Hawley y Whitton 1991). Las muestras fueron colectadas en filtros negros de policarbonato y luego montadas en portaobjetos de la misma manera que fuera explicado en la página 33 del Capítulo 1. Cada filtro fue examinado bajo microscopio de epifluorescencia (Olympus BX40). El bacterioplancton fue concentrado y contado en filtros negros de policarbonato teñidos con DAPI como se explicó en la página 33 del Capítulo 1. Las bacterias fueron contadas usando un microscopio de epifluorescencia con excitación de UV. Para las estimaciones de abundancia del picoplancton y del bacterioplancton se contaron un mínimo de 20 campos y 400 individuos en cada preparado (error <15%).

Las concentraciones de clorofila *a* fitoplanctónica (Chl *a*) en los distintos microcosmos fueron determinadas luego de la extracción con metanol (Lopretto y Tell 1995) y fueron realizadas por el Lic. Lagomarsino en el INTECH.

Zooplancton

Las muestras para análisis cuantitativo del zooplancton se tomaron en frascos de PVC luego del filtrado de un volumen conocido de agua a través de una red de 55 μm de poro.

Se estimó la abundancia del zooplancton sólo para los tiempos inicial y final, ya que para los recuentos del zooplancton se requiere filtrar un gran volumen de agua, lo que resultaría impracticable en los microcosmos a los tiempos intermedios. A tiempo inicial se tomó solo una muestra proveniente del tanque de gran volumen, ya que iniciado el experimento todos los microcosmos tuvieron agua del mismo origen y características. Al final del experimento todo el contenido de las bolsas se filtró y a partir del volumen de filtrado se calculó la densidad. Las muestras de microzooplancton (<200 μm) se analizaron en el laboratorio bajo un microscopio binocular en cámaras Sedgwick-Rafter de 1 ml, obteniendo las submuestras con una pipeta Hensen-Stempel. Los recuentos del macrozooplancton (>200 μm) se realizaron en cámaras de 5 ml Bogorov bajo lupa, y las submuestras tomadas con un dispositivo de Russell. Se discriminaron los estadios larvales y el número de las alícuotas contadas (por lo menos tres) se calculó con una estimación del error menor al 10%. Las abundancias del zooplancton fueron expresadas como individuos/litro. El análisis

del zooplancton fue llevado a cabo por el Dr. Sinistro en el Laboratorio de Limnología de la FCEyN, UBA.

Variables físico-químicas del agua

Se midieron *in situ* en cada fecha de muestreo y en cada microcosmos, la temperatura del agua, el pH y la conductividad con un sensor de campo HANNA HI 991301, la concentración de oxígeno disuelto con un sensor HANNA HI 9143 y la turbidez nefelométrica con un sensor 2100P Hach®.

Las muestras de agua para los análisis químicos fue filtrada inmediatamente luego del muestreo a través de filtros Whatman® GF/F. El fósforo reactivo soluble (FRS), nitrito, nitrato y amonio fueron medidos de la misma manera que fuera explicado en la página 34 del Capítulo 1, siguiendo la metodología de APHA (2005). El nitrógeno orgánico (NO) se determinó mediante el método de Kjeldahl (APHA 2005). El nitrógeno total (NT) se consideró como la suma de los nitratos, nitritos y el nitrógeno orgánico.

El fósforo total (FT, a partir de muestras de agua sin filtrar) y el fósforo total disuelto (FTD, a partir de muestras de agua filtradas por GF/F) fueron convertidos a FRS luego de la digestión ácida con persulfato de potasio (APHA 2005). La alcalinidad se determinó por titulación con H₂SO₄ 0,1 N (APHA 2005).

La determinación de los sólidos totales en suspensión (STS) y de la materia orgánica (MO) no se efectuó al t1 y al t2 debido a gran cantidad de volumen necesaria para realizarla. La concentración de la MO fue determinada como la diferencia de masa luego del filtrado de la muestra de agua por filtros Whatman® GF/F previamente calcinados a 550°C por 2 horas y los STS por desecación en estufa (APHA 2005).

Los análisis químicos del agua de los microcosmos se realizaron en el INTECH y fueron llevados a cabo por el Lic. Lagomarsino.

Las muestras de agua para determinar la concentración de glifosato fueron congeladas hasta su análisis. Las concentraciones de glifosato fueron determinadas mediante cromatografía iónica utilizando un cromatógrafo DIONEX DX-100 con un detector de conductividad y un "loop" de 25 µl de muestra (Pessagno *et al.* 2008). Se utilizó un DIONEX AS-4 como columna cromatográfica analítica. Se eligió como eluyente una mezcla de NaOH/Na₂CO₃ 4 mM/9 mM con un flujo de 2 ml/min. El error experimental estuvo por debajo del 5%. La determinación de las concentraciones de glifosato en el agua fue llevada a cabo por la Lic. Di Fiori en el Laboratorio de Química del Agua del INQUIMAE, FCEyN, UBA.

Análisis estadístico

Antes de cada prueba estadística, se llevaron a cabo las comprobaciones de Kolmogorov-Smirnov (con corrección de Lilliefors), de la mediana de Levene y de esfericidad de Mauchley, para corroborar normalidad, homocedacia y esfericidad, respectivamente. Cuando los datos no cumplieron con alguno de estos supuestos, los valores fueron transformados (raíz cuadrada o logaritmo) según fuera necesario. Para todas las variables, se realizaron análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA MR), con dos tratamientos (control y Glifosato Atanor[®]) y cinco fechas de muestreo (0, 1, 7, 14 y 21 días). Se realizaron análisis de efectos simples cuando la interacción tiempo-tratamiento resultó significativa. Se llevaron a cabo comparaciones múltiples *a posteriori* usando el método de Tukey (Zar 1996). Únicamente para el zooplancton, se analizaron las diferencias entre los tratamientos a tiempo final mediante ANOVA de 1 factor.

RESULTADOS

Efectos sobre la comunidad perifítica

A partir del análisis taxonómico de las muestras de ambos tratamientos, se obtuvo un total de 31 especies de algas perifíticas pertenecientes a los siguientes grupos algales Chlorophyta, Cyanobacteria y Bacillariophyta (Tabla 4.1).

CHLOROPHYTA	CYANOBACTERIA	BACILLARIOPHYTA
<i>Ankistrodesmus spiralis</i>	<i>Anabaena</i> sp.	<i>Cymbella</i> spp.
<i>Bulbochaete</i> sp.	<i>Chroococcus minutus</i>	<i>Navicula</i> spp.
<i>Coelastrum astroideum</i>	<i>Chroococcus turgidus</i>	<i>Nitzschia</i> spp.
<i>Cosmarium sexangulare</i>	<i>Chroococcus</i> sp.	
<i>Cosmarium</i> sp.	<i>Eucapsis starmachii</i>	
<i>Crucigeniella rectangularis</i>	<i>Eutetramorus</i> sp.	
<i>Dictyosphaerium</i> sp.	<i>Merismopedia tenuissima</i>	
<i>Didymocystis fina</i>	<i>Microcystis firma</i>	
<i>Monoraphidium irregulare</i>	<i>Oscillatoria</i> sp.	
<i>Monoraphidium minutum</i>	<i>Phormidium</i> sp.	
<i>Mougeotia</i> sp.	<i>Spirulina</i> sp.	
<i>Nephrocytium perseverans</i>		
<i>Oedogonium</i> spp.		
<i>Oocystis parva</i>		
<i>Scenedesmus aculolatus</i>		
<i>Scenedesmus ecornis</i>		
<i>Tetraedrum minimum</i>		

Tabla 4.1. Especies de algas del perifiton halladas en los microcosmos de ambos tratamientos a lo largo de la experiencia.

Chlorophyta (algas verdes) fue el grupo algal predominante durante toda la experiencia en ambos tratamientos, con un promedio general de densidad total (vivas + muertas) de 132.320 ± 63.295 algas/cm² (media \pm desvío estándar) representando el 53% en promedio para todo el estudio. En segundo lugar, se encontraron las cianobacterias (media general para la experiencia, 73.299 ± 31.698 algas/cm²) y por último Bacillariophyta (diatomeas) con un valor medio de abundancia total de 40.653 ± 23.334 algas/cm² (Fig. 4.3a, b). El ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas en la interacción tiempo-tratamiento para la densidad total de los tres grupos algales (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.2), y la comparación de medias entre los tratamientos para los distintos grupos arrojó diferencias significativas a partir de los 7 días de iniciada la experiencia para la densidad de diatomeas totales y desde los 14 días para la densidad total de cianobacterias y algas verdes, siendo en todos los casos mayor en presencia del herbicida. Se registró una densidad total significativamente mayor en los microcosmos control en comparación a los tratados, únicamente en el

tiempo t1 para la densidad total de Chlorophyta. Cabe aclarar, que en el caso de las cianobacterias perifíticas no se detectaron organismos muertos, por lo que la densidad total se corresponde con la densidad de organismos vivos.

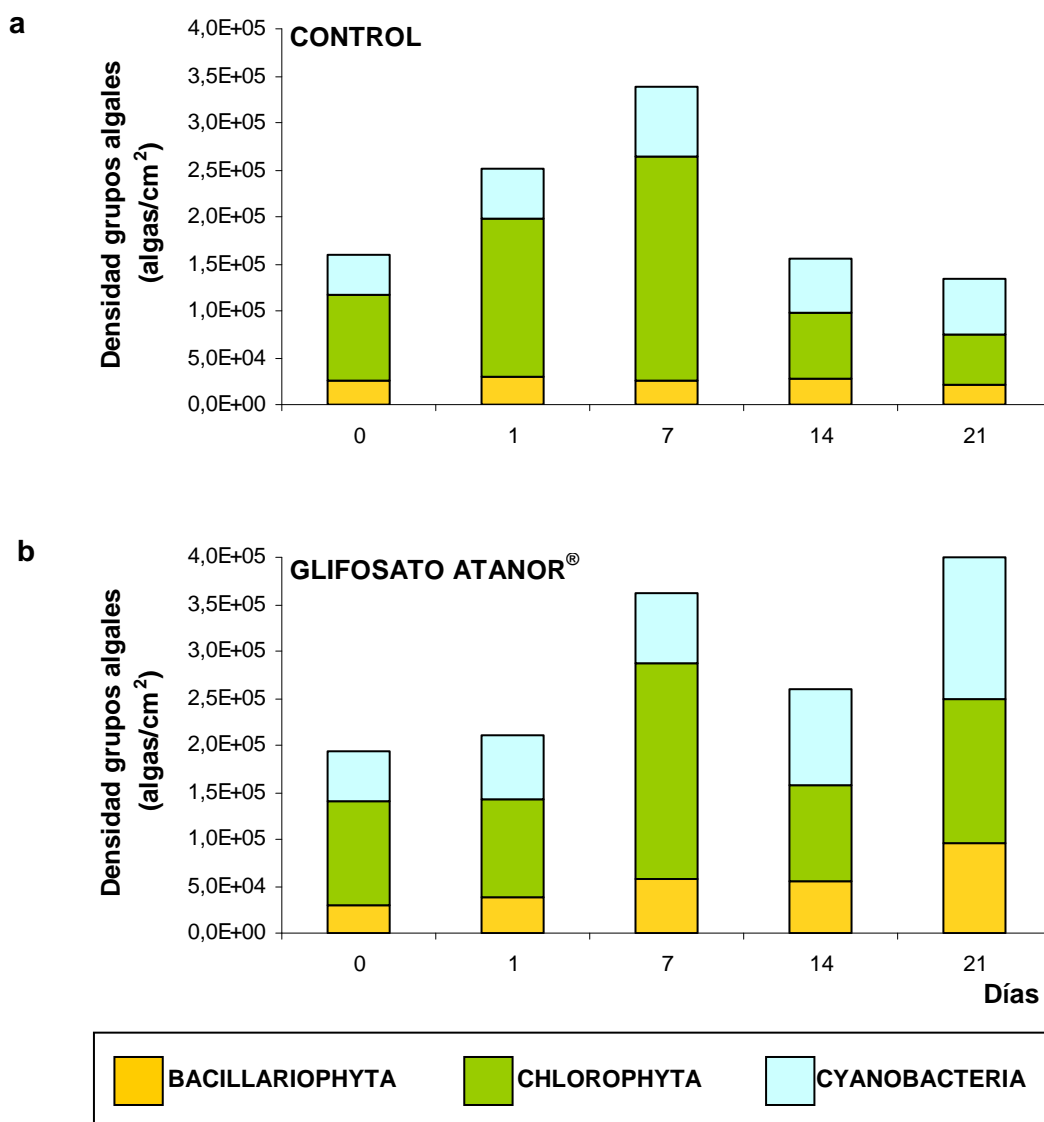


Fig. 4.3. Densidad promedio total (vivas + muertas) de los distintos grupos algales para los microcosmos **(a)** control y **(b)** tratados con Glifosato Atanor® a lo largo del estudio.

VARIABLE	EFECTO		
	Tratamiento	Tiempo	Trat. x Tiempo
Verdes totales	0,200	0,000	0,000
Ciano totales	0,004	0,000	0,000
Diatos totales	0,003	0,000	0,000

CAPÍTULO 4: Impacto en comunidades microbianas en microcosmos

Peri total	0,018	0,000	0,000
Vivas totales	0,035	0,000	0,000
Muertas totales	0,001	0,000	0,000
Verdes vivas	0,228	0,000	0,000
Verdes muertas	0,018	0,000	0,003
Diato vivas	0,028	0,000	0,000
Diato muertas	0,001	0,000	0,000
Filam	0,004	0,000	0,000
%filam/totales	0,000	0,000	0,000

Tabla 4.2. Niveles de significancia de los ANOVA MR para los efectos del tratamiento, el tiempo y la interacción tratamiento-tiempo en los microcosmos control y tratados en los 5 tiempos para la densidad total de Chlorophyta (Verdes totales), Cyanobacteria (Ciano totales), Bacillariophyta (Diató totales) y algas perifíticas (Peri total), la densidad de algas vivas (Vivas totales) y muertas (Muertas totales) perifíticas, la densidad de Chlorophyta y Bacillariophyta del perifiton vivas (Verdes vivas, Diató vivas) y muertas (Verdes muertas, Diató muertas), la densidad de algas verdes filamentosas (Filam) del perifiton y el porcentaje de abundancia de filamentosas con respecto a las algas perifíticas totales (%filam/totales). Valores de $p < 0,05$ están indicados en rojo.

La densidad total (vivas + muertas) de algas perifíticas mostró un rango de valores entre 117.618 y 456.436 algas/cm² durante el experimento. Se observaron diferencias significativas entre los tiempos, los tratamientos y en la interacción tiempo-tratamiento para esta variable (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.2), obteniéndose en la comparación de medias una densidad total significativamente mayor en el tratamiento con Glifosato Atanor® con respecto al control a los 14 y 21 días de iniciada la experiencia (Fig. 4.4). Se registró un aumento significativo de la densidad total desde el t₀ hasta la primer semana de muestreo y luego una disminución significativa a la segunda semana para ambos tratamientos. En el último muestreo se registró un aumento significativo de la densidad total en los microcosmos tratados, con el mayor valor medio de toda la experiencia, en cambio en los controles el valor medio se mantuvo constante con respecto al muestreo anterior.

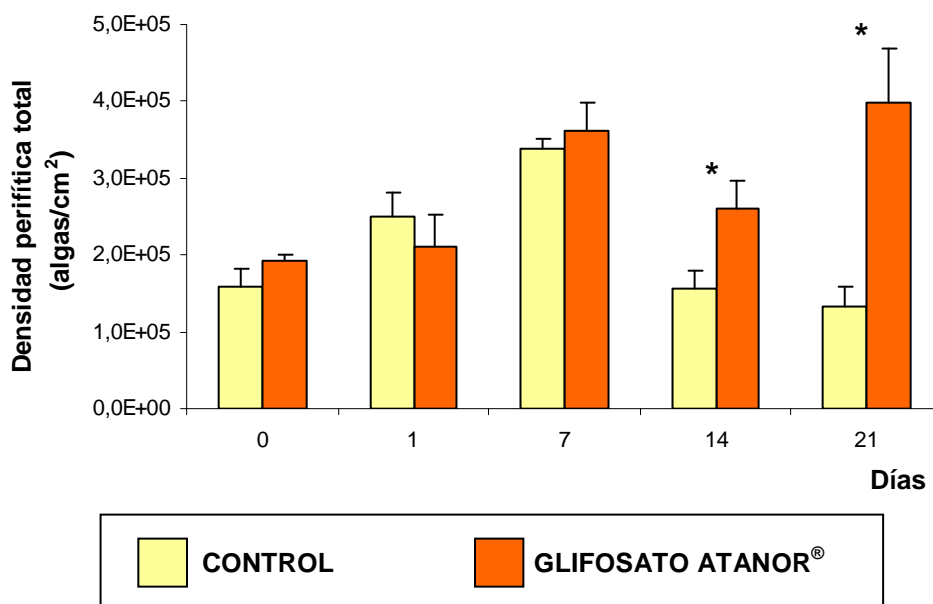


Fig. 4.4. Densidad media perifítica total (vivas + muertas) a lo largo de la experiencia para ambos tratamientos. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

Para toda la experiencia, el valor promedio de la abundancia de algas vivas del perifiton del tratamiento control fue de 196.963 ± 87.278 algas/cm² (media \pm DE) y del tratamiento con Glifosato Atanor®, 251.182 ± 75.865 algas/cm². Y la abundancia media de algas muertas del perifiton para todo el estudio fue de 10.899 ± 9.862 algas/cm² para los microcosmos control y de 33.500 ± 21.471 algas/cm² para los tratados con glifosato. El ANOVA de medidas repetidas marcó diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos, los tiempos y en la interacción para ambas variables perifíticas (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.2). Se observaron valores de abundancia de algas vivas significativamente mayores en los microcosmos tratados para los tiempos t3 y t4 (Fig. 4.5a), en cambio la abundancia de muertas mostró siempre valores significativamente mayores en los adicionados con herbicida a partir del primer día de muestreo (Fig. 4.5b). La abundancia de algas vivas muestra un patrón a lo largo del tiempo que es similar al que puede observarse para la densidad perifítica total (Fig. 4.4). La abundancia de algas muertas registró un aumento significativo en los microcosmos control recién a los 14 y 21 días del experimento con respecto a las fechas anteriores, sin embargo en los microcosmos tratados con el herbicida el aumento se aprecia desde el t1 incrementándose significativamente hasta el t4.

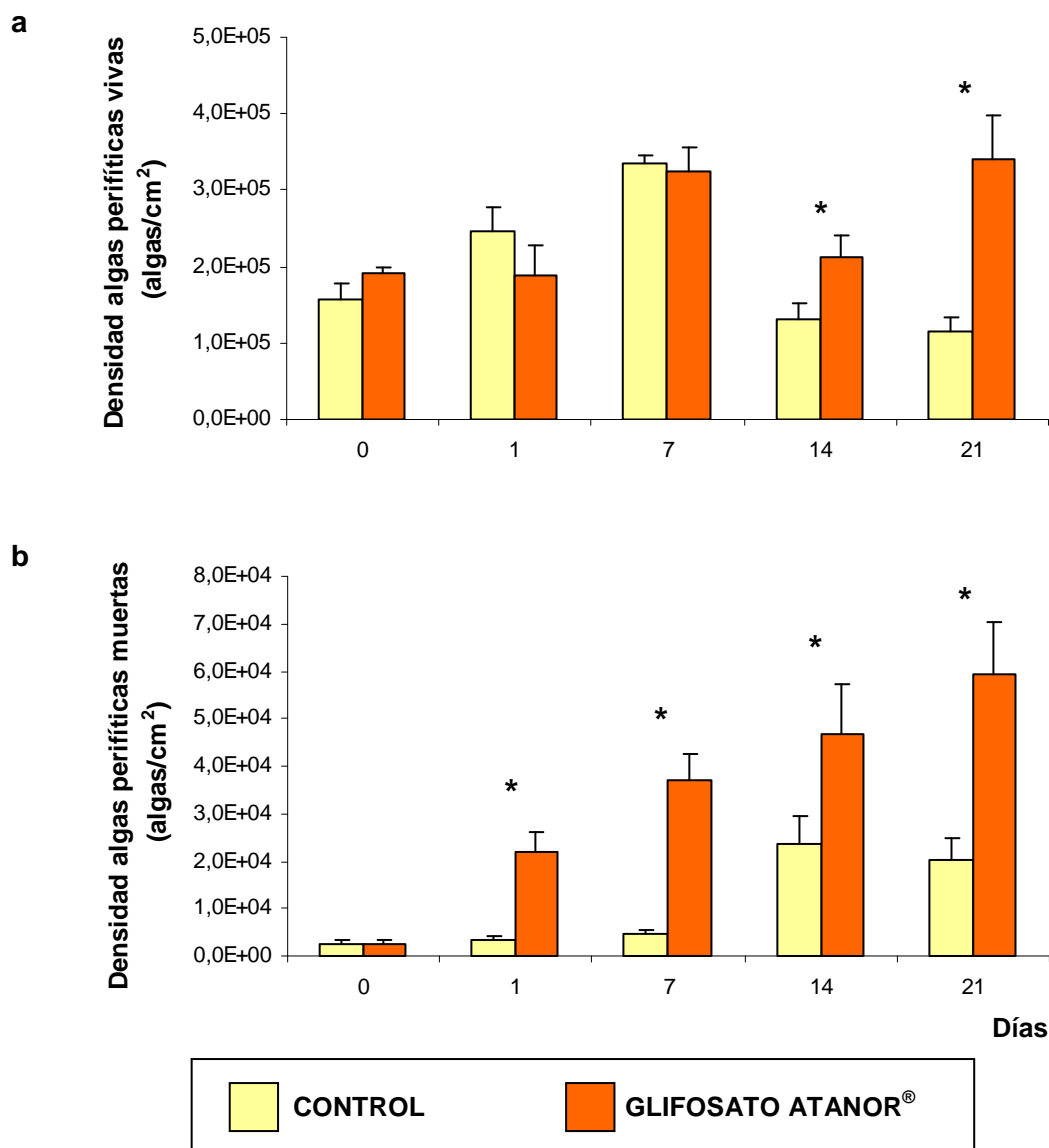


Fig. 4.5. Densidad media de algas perifíticas **(a)** vivas y **(b)** muertas a lo largo del estudio para ambos tratamientos. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

El valor promedio de la densidad de algas verdes vivas de todo el experimento fue de 128.720 ± 63.747 algas/cm² (media \pm DE). La figura 4.6a muestra la evolución, en el tiempo que duró la experiencia, que sufrió la densidad de algas verdes vivas, y que es muy similar al patrón visto en las algas verdes totales, registrándose también en este caso diferencias significativas en la interacción (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.2) y entre los tratamientos a los tiempos t1, t3 y t4. La media de la densidad de algas verdes muertas a lo largo del estudio fue de 2.709 ± 2.464 algas/cm² y de 4.490 ± 2.621 algas/cm², para los tratamientos control y con herbicida, respectivamente. El

ANOVA de medidas repetidas arrojó diferencias significativas, para la densidad de Chlorophyta muertas, en la interacción tiempo-tratamiento (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.2) y la comparación de medias registró valores significativamente mayores en el tratamiento con glifosato con respecto a los controles (Fig. 4.6b). En la figura 4.6b se puede observar un aumento significativo de la densidad de algas verdes muertas a partir del día 1 en el tratamiento con Atanor® y a los 14 y 21 días con respecto a las fechas anteriores en los controles.

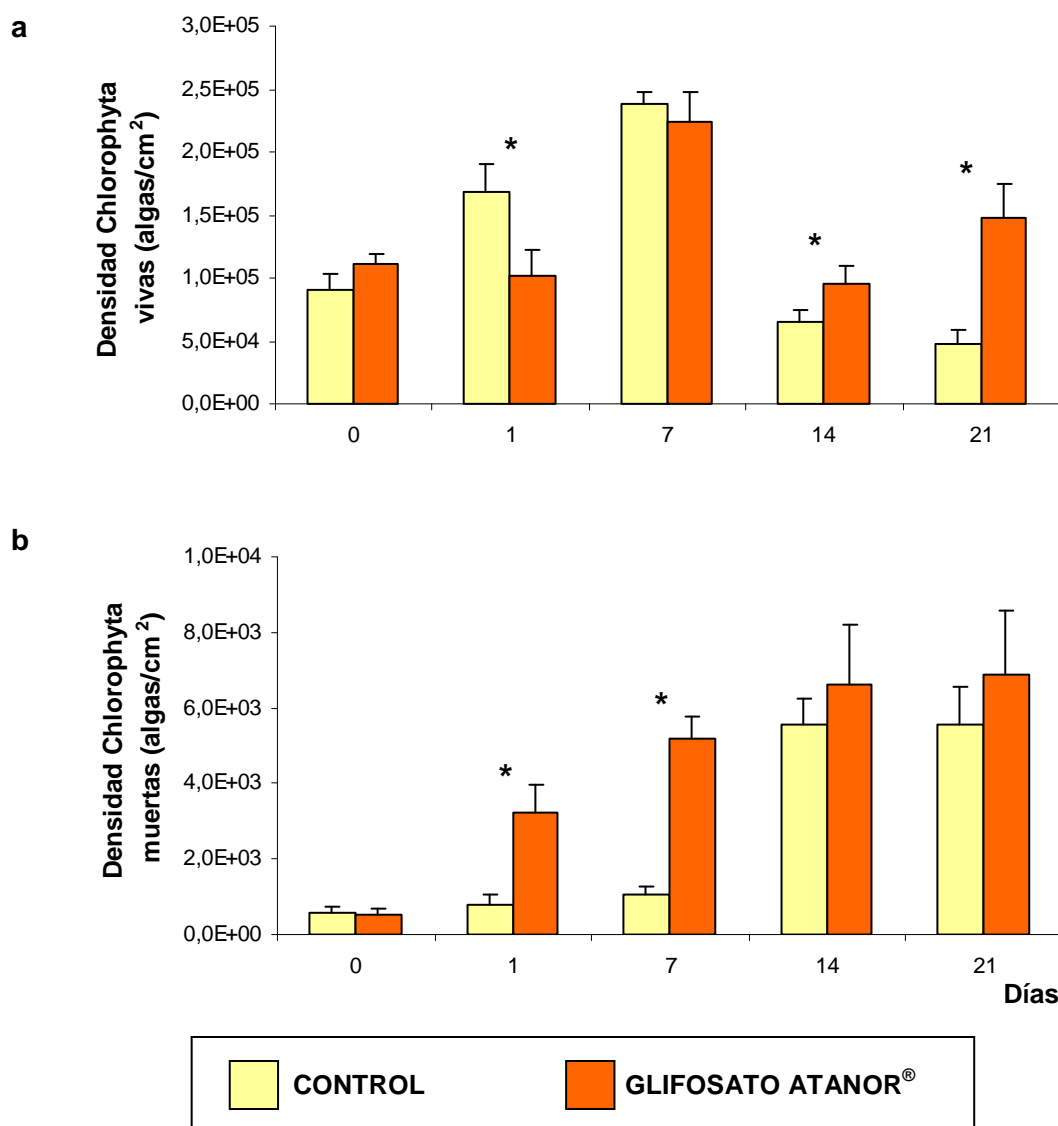
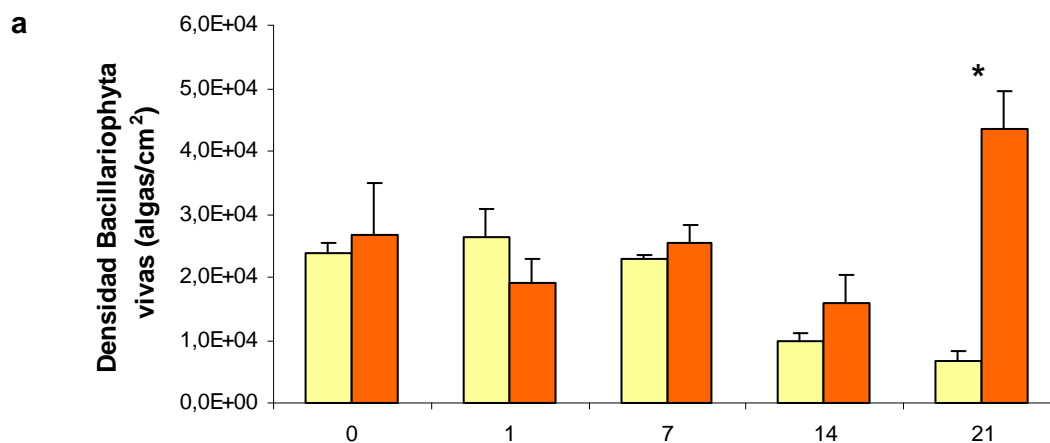


Fig. 4.6. Densidad media de Chlorophyta del perifiton **(a)** vivas y **(b)** muertas para ambos tratamientos durante toda la experiencia. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

El rango de densidad de las diatomeas vivas en el estudio fue de 5.841 hasta 48.988 algas/cm², ambos valores extremos fueron registrados en el tiempo t4, para el tratamiento control y con glifosato, respectivamente. Se obtuvieron diferencias significativas en la interacción tiempo-tratamiento para esta variable (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.2), y comparando las medias se obtuvieron en la última fecha diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 4.7a). La abundancia de diatomeas muertas varió entre 1.244 y 24.200 algas/cm² y entre 1.575 y 59.690 algas/cm², para los microcosmos control y tratados, respectivamente. El patrón en el tiempo observado (Fig. 4.7b) y el análisis estadístico obtenido (Tabla 4.2) para la densidad de diatomeas muertas fue muy similar al mostrado para la densidad de algas muertas en la figura 4.5b, ya que el mayor porcentaje de algas muertas se debe a las diatomeas. En el tratamiento control, se observa una tendencia a disminuir en el tiempo de las diatomeas vivas (Fig. 4.7a) y a aumentar de las diatomeas muertas (Fig. 4.7b). Sin embargo, en los microcosmos tratados, los valores de abundancia de diatomeas vivas se mantienen constantes durante el estudio excepto en el último muestreo en el cual se registra un aumento significativo de estas algas con respecto a los tiempos anteriores (Fig. 4.7a), y se observa un progresivo aumento de diatomeas muertas, significativamente mayor que en los controles a partir del día 1 y hasta el final del experimento (Fig. 4.7b).



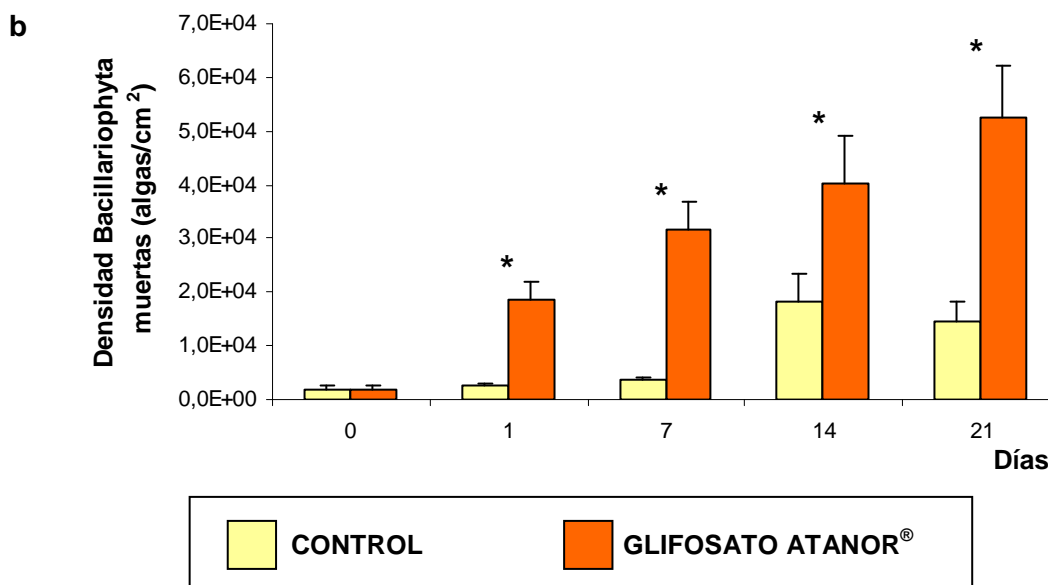


Fig. 4.7. Densidad media de diatomeas del perifiton **(a)** vivas y **(b)** muertas a lo largo del experimento en los microcosmos control y adicionados con glifosato. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

Desde t2 y hasta el final del estudio se podía observar a ojo desnudo sobre los sustratos artificiales de los microcosmos con adición de glifosato, un ensamble perifítico con gran cantidad de metafiton. Al microscopio se observaron dentro de las algas verdes filamentosas especies metafiticas de los órdenes Oedogoniales y Zygnematales, particularmente *Oedogonium* spp. y *Mougeotia* sp., respectivamente. Los rangos de valores de densidad de algas verdes filamentosas estuvieron entre 1.526 y 4.582 algas/cm² y entre 1.360 y 26.378 algas/cm², para el tratamiento control y con glifosato, respectivamente. El ANOVA de medidas repetidas para la variable densidad de algas verdes filamentosas registró diferencias significativas entre los tratamientos, los tiempos y en la interacción tiempo-tratamiento (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.2); la comparación de medias mostró valores de densidad significativamente mayores en los microcosmos tratados con respecto a los controles a partir del día 1 del estudio (Fig. 4.8a). La densidad de algas filamentosas se mantuvo constante a lo largo del tiempo en el tratamiento control, sin embargo, se observa un aumento gradual en los microcosmos con glifosato que es estadísticamente significativo a partir de los 7 días de exposición (Fig. 4.8a). En la figura 4.8b se puede observar la progresión en el tiempo del porcentaje de la abundancia de algas verdes filamentosas con respecto al total de algas perifíticas. Los valores promedio para todo el experimento de estos porcentajes fueron de $1,53 \pm 0,66$ % (media \pm DE) y $2,84 \pm 1,96$

%, para el tratamiento control y con herbicida, respectivamente. Para esta variable se observaron diferencias significativas entre los tiempos, tratamientos y en la interacción (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.2). Obteniéndose diferencias significativas entre los tratamientos desde el día 1 y hasta el día 21, con valores medios siempre superiores en los microcosmos expuestos al glifosato. El porcentaje de filamentosas aumentó significativamente en el tiempo en el tratamiento con herbicida a partir del inicio del estudio.

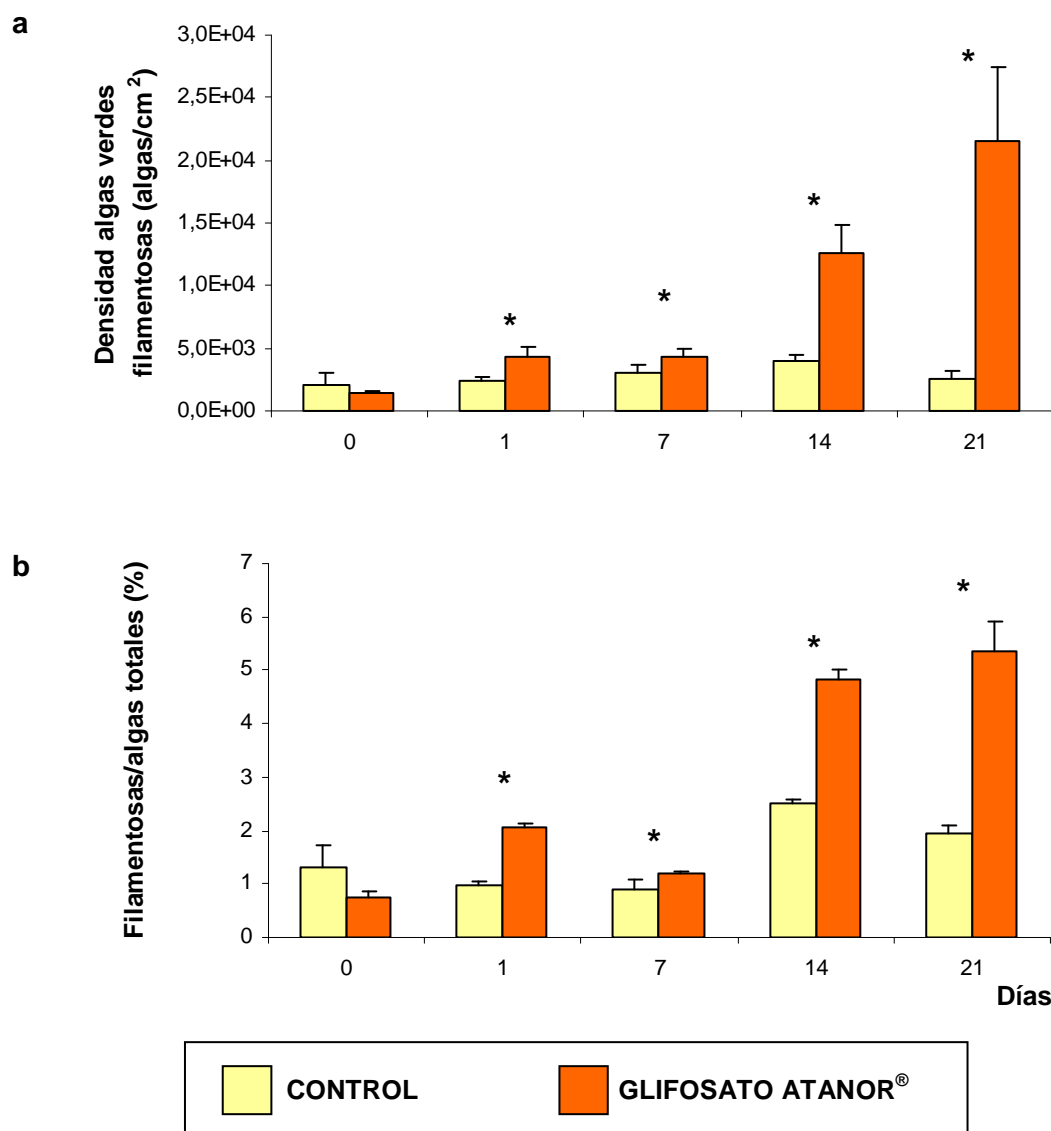


Fig. 4.8. (a) Densidad promedio de algas verdes filamentosas en ambos tratamientos a lo largo de la experiencia. **(b)** Porcentaje medio de la densidad de algas verdes filamentosas con respecto a la abundancia total de algas perifíticas. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

El rango de valores del PS estuvo entre 46,43 y 334,03 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, las C oscilaron entre 10,49 y 74,89 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y el PSLC fluctuó entre 28,46 y 259,13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a lo largo del estudio. Se pudieron observar diferencias significativas entre los tiempos, los tratamientos y la interacción tratamiento-tiempo para el PS, las C y el PSLC (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.3). Las comparaciones de medias mostraron, para las tres variables de masa, un aumento significativo en el tratamiento con Glifosato Atanor[®] con respecto al control a partir de los 14 días de exposición al herbicida (Fig. 4.9a-c), y no registraron diferencias significativas en los controles a lo largo del tiempo, excepto para el PSLC, para el que se obtuvo una disminución en la última fecha de muestreo (Fig. 4.9c). Las comparaciones de medias en el tiempo de los microcosmos tratados mostraron para el PS, un aumento significativo de ~ 3 y ~ 2 veces a los 14 y 21 días del experimento, respectivamente, con respecto a los valores de los días 0 y 1 (Fig. 4.9a). Para las cenizas, se registró un incremento significativo a partir del tiempo t2 con respecto al t0 y t1 en los microcosmos con Glifosato Atanor[®], con un aumento de ~ 3 veces a los 7 días y de ~ 5 en las dos últimas fechas de muestreo (Fig. 4.9b). Y para el PSLC, sólo se observó un incremento significativo entre los días 0 y 14 en el tratamiento con herbicida (Fig. 4.9c).

VARIABLE	EFECTO		
	Tratamiento	Tiempo	Trat. x Tiempo
PS	0,012	0,000	0,000
C	0,001	0,000	0,000
PSLC	0,029	0,001	0,002
P-Chl <i>a</i>	0,000	0,000	0,000
P-Chl <i>b</i>	0,000	0,000	0,003
P-Chl <i>a+b</i>	0,000	0,000	0,001
P-Chl <i>a/b</i>	0,087	0,000	0,000
Carotenos	0,000	0,000	0,000
IA	0,091	0,000	0,003
AM	0,325	0,000	0,036
MDA	0,498	0,006	0,015

Tabla 4.3. Niveles de significancia de los ANOVA MR para los efectos del tratamiento, el tiempo y la interacción tratamiento-tiempo en los microcosmos control y tratados en los 5 tiempos para las distintas fracciones de masa perifítica: el peso seco (PS), las cenizas (C), el peso seco libre de cenizas (PSLC), las concentraciones de clorofila a

(P-Chl *a*) y *b* (P-Chl *b*) y la relación clorofilas *a/b* (P-Chl *a/b*) y el contenido de carotenos totales, el índice autotrófico (IA), la actividad mitocondrial (AM) y la concentración de malondialdehído (MDA) del perifiton. Valores de $p < 0,05$ están indicados en rojo.

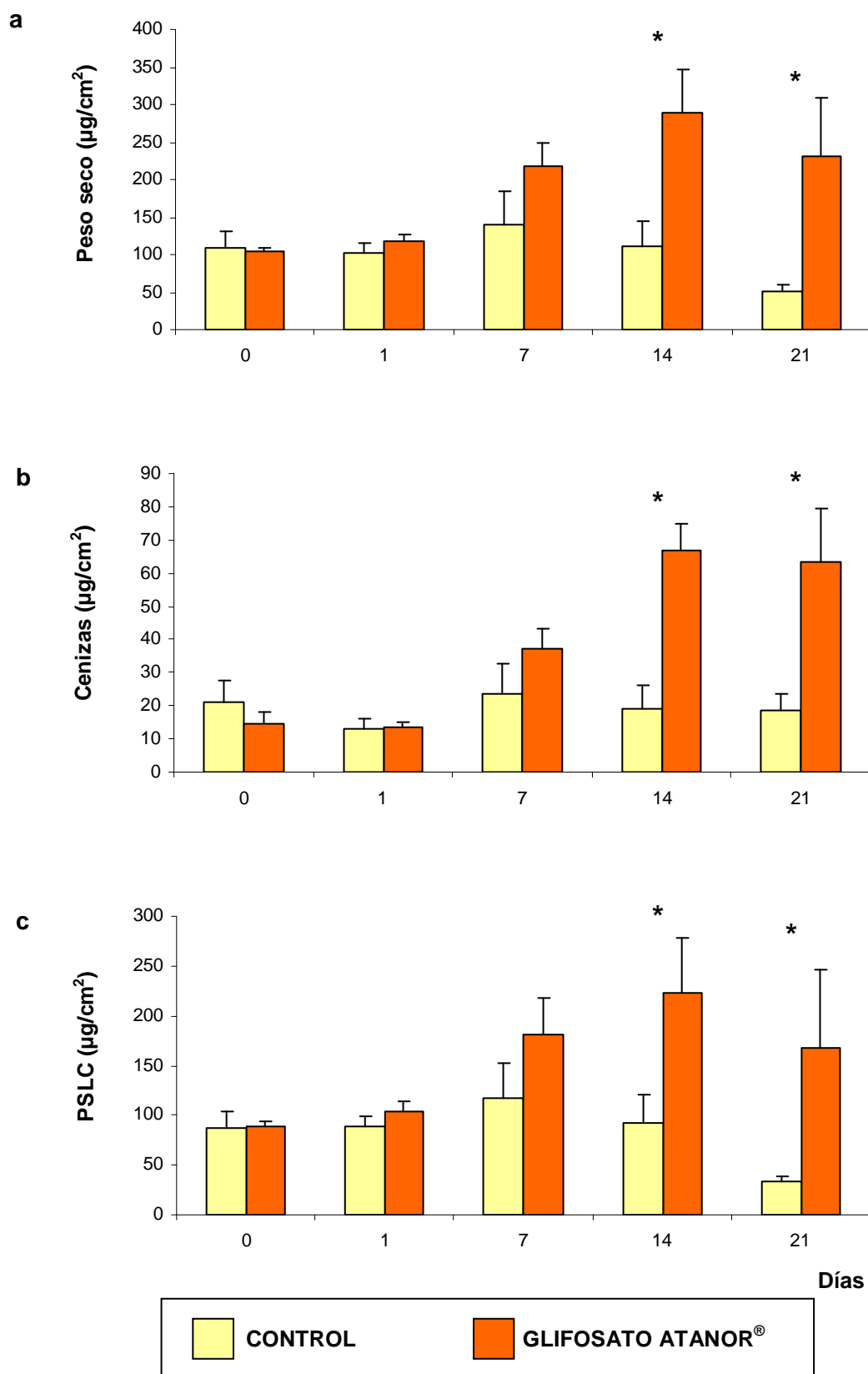
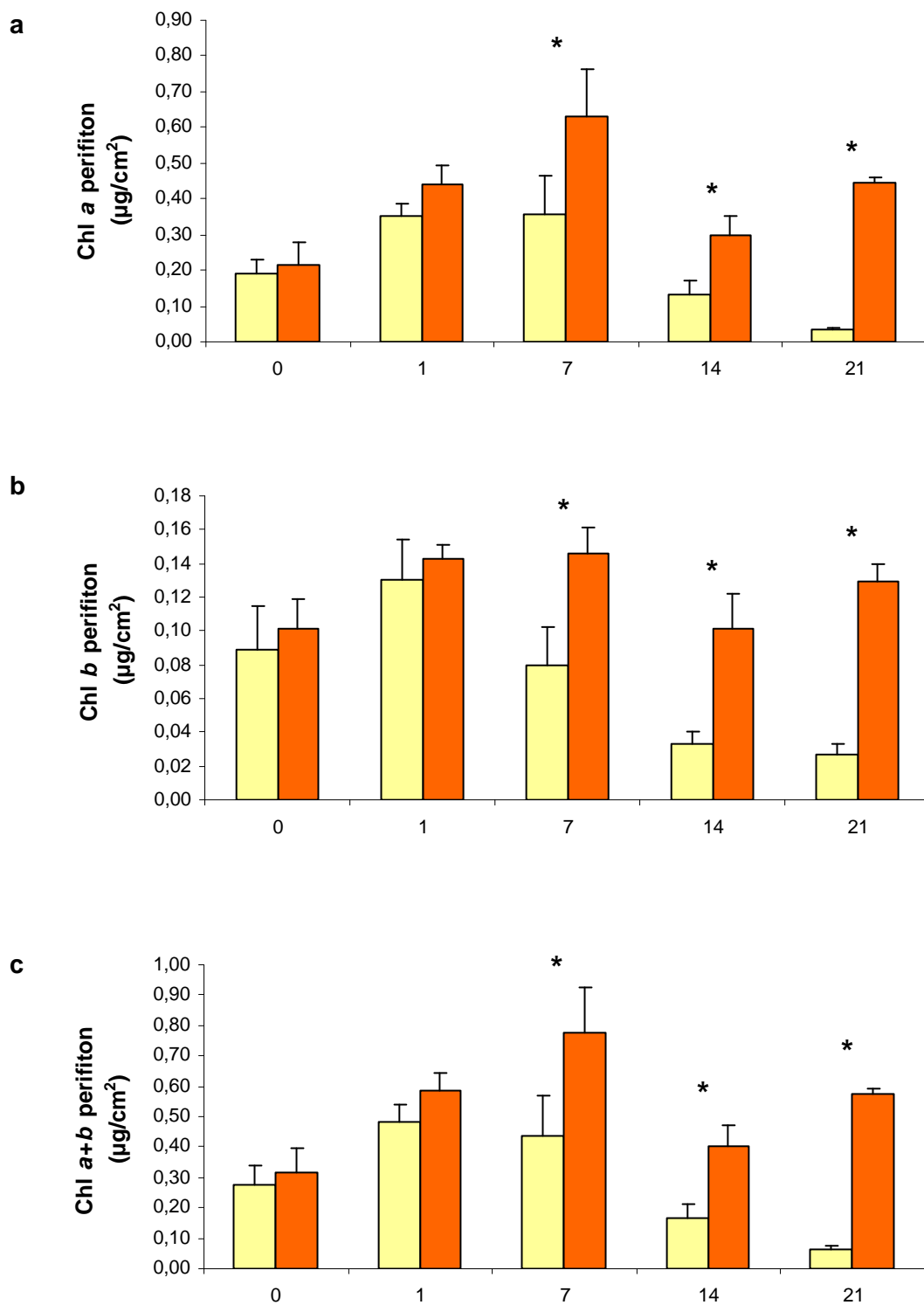


Figura 4.9. Valores medios de **(a)** peso seco, **(b)** cenizas y **(c)** peso seco libre de cenizas (PSLC) en los microcosmos control y tratados a lo largo del período de muestreo. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

La concentración de clorofila *a* perifítica durante el experimento fluctuó entre 0,03 y 0,44 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y entre 0,15 y 0,72 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, la clorofila *b* osciló entre 0,02 y 0,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y entre 0,08 y 0,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y los rangos de clorofila total (*a+b*) estuvieron entre 0,05 y 0,54 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y entre 0,24 y 0,87 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, en los tratamientos control y con herbicida, respectivamente. Se pudieron observar diferencias significativas entre los tiempos, los tratamientos y la interacción para P-Chl *a*, P-Chl *b* y P-Chl *a+b* (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.3). En las figuras 4.10a-c se puede observar que el contenido promedio de clorofilas *a*, *b* y total del perifiton expuesto al herbicida fue siempre mayor que en los controles, y las comparaciones de medias mostraron diferencias significativas entre los tratamientos a partir de los 7 días de exposición al formulado para estas tres variables, para las cuales también se registraron diferencias significativas entre los tiempos para los dos tratamientos. La máxima diferencia registrada en el contenido de clorofila *a* perifítica entre ambos tratamientos se obtuvo a los 21 días de iniciada la experiencia y fue ~15 veces mayor en el tratamiento con herbicida con respecto al control (Fig. 4.10a). El análisis de P-Chl *a* a lo largo del tiempo, muestra que la comunidad algal en el control presentó un decrecimiento significativo a partir de la segunda semana y hasta el fin del período de estudio, registrándose un valor promedio 6 veces menor en la última fecha de muestreo con respecto al día 0. El contenido de clorofila *a* del perifiton expuesto al Glifosato Atanor® creció significativamente hasta la primer semana para luego disminuir a los 14 días de la experiencia (Fig. 4.10a). En la última fecha se registró una concentración de clorofila *b* perifítica 4 veces mayor en los microcosmos tratados con respecto a los controles (Fig. 4.10b). Se observó una disminución de aproximadamente el 67% en el contenido de P-Chl *b* en las últimas dos semanas de la experiencia con respecto al t0 en los tratamientos control. El análisis de P-Chl *b* a lo largo del tiempo en los microcosmos con herbicida mostró un aumento significativo en el primer día de exposición, se mantuvo constante la primer semana para luego disminuir significativamente a las dos semanas (Fig. 4.10b). El análisis de P-Chl *a+b* a lo largo del experimento en ambos tratamientos mostró un aumento significativo en el primer día de exposición. La concentración de clorofila total en los controles se mantuvo constante hasta la primer semana para luego disminuir significativamente hasta los 14 días y luego se mantuvo

sin variación hasta el último día. Los microcosmos con herbicida registraron un incremento significativo (de 2,5 veces) de la clorofila total con respecto al t0 a la semana de tratamiento para luego disminuir significativamente a las dos semanas (Fig. 4.10c).



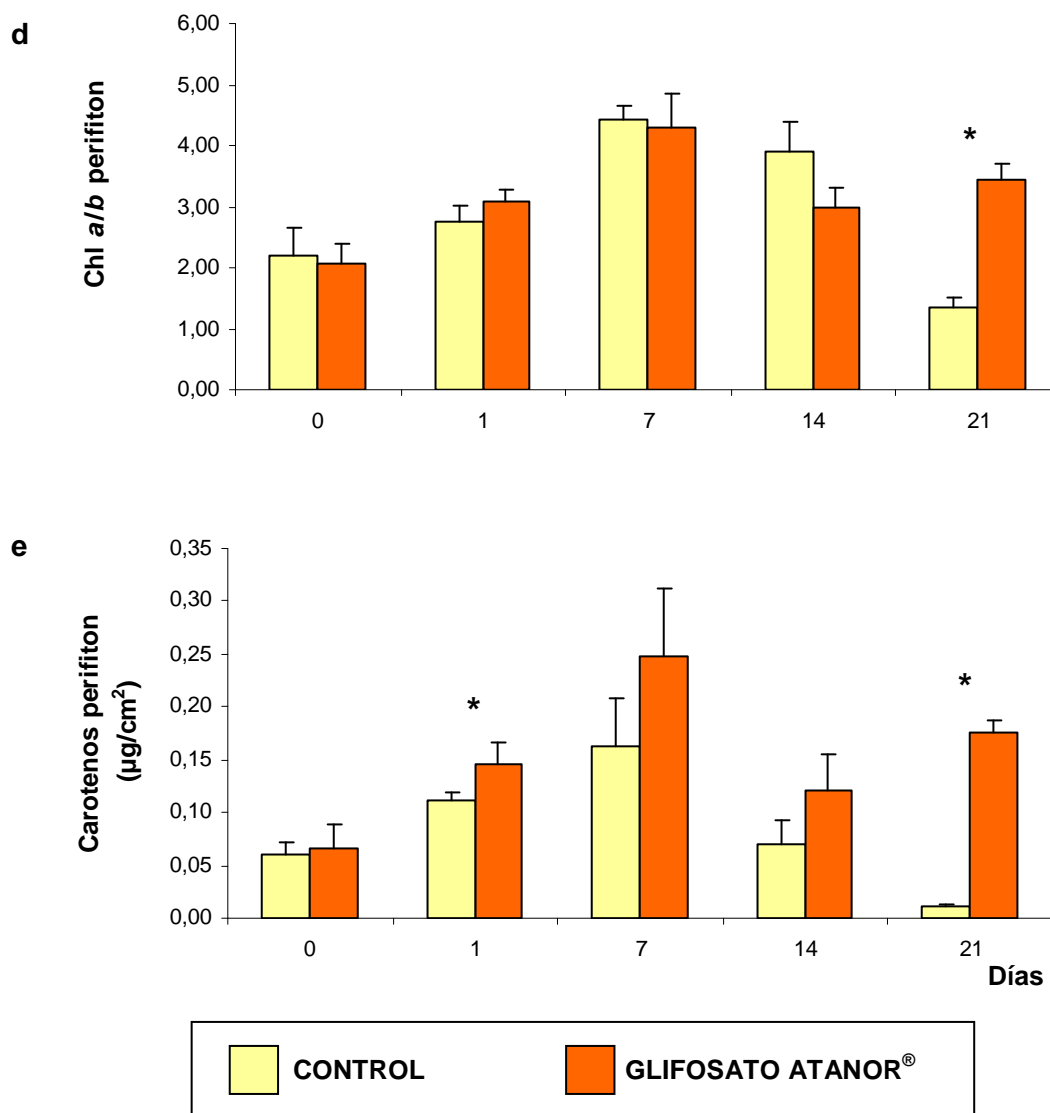


Figura 4.10. Concentración media de (a) clorofila *a*, (b) clorofila *b*, (c) clorofila total (*a*+*b*), (d) relación clorofila *a/b* y (e) carotenos totales del perifiton en los microcosmos control y tratados a lo largo del experimento. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

La relación clorofila *a/b* fluctuó entre 1,14 y 4,64 y entre 1,76 y 4,77, en los microcosmos control y tratados, respectivamente. Se registraron diferencias significativas entre los tiempos y la interacción tratamiento-tiempo para P-Chl *a/b* (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.3). Las comparaciones de medias mostraron, para esta variable, valores significativamente mayores en los microcosmos con formulado con respecto a los controles a los 21 días de exposición, esto se debió a un fuerte decaimiento en la relación clorofila *a/b* en los controles en esa fecha (Fig. 4.10d). Esta

relación a lo largo del tiempo mostró, en los microcosmos control, un aumento significativo a los 7 días, que se mantuvo sin variaciones hasta la segunda semana, para decaer significativamente al final de la experiencia. En cambio, el perifiton tratado con el herbicida, mostró un aumento significativo hasta los 7 días para luego disminuir a las 2 semanas (Fig. 4.10d).

El contenido de carotenos totales del perifiton estuvo entre 0,01 y 0,20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y entre 0,04 y 0,29 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, en los microcosmos control y tratados, respectivamente. El ANOVA MR arrojó diferencias significativas entre los tratamientos, los tiempos y en la interacción para el contenido de carotenos totales (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.3), y comparando las medias se registraron diferencias significativas entre los tratamientos en los tiempos t1 y t4, siempre con valores mayores en los microcosmos con Glifosato Atanor® (Fig. 4.10e). Para los carotenos totales también se registraron diferencias significativas a lo largo del tiempo para ambos tratamientos. En la figura 4.10e se puede observar un aumento en el contenido promedio de carotenos en ambos tratamientos hasta los 7 días, que resultó significativo en los microcosmos con herbicida, sin embargo no se registraron diferencias significativas en los controles. A las dos semanas de iniciado el experimento se observó un descenso significativo de los carotenos en los dos tratamientos, que siguió disminuyendo significativamente en los controles y aumentando en los tratados con herbicida.

El promedio general (\pm DE) del índice autotrófico para todo el experimento fue de $487,42 \pm 269,88$, con rangos que van de 223,31 a 1264,39 y de 187,86 a 1001,02, en los microcosmos control y tratados, respectivamente. El ANOVA MR mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos y en la interacción tiempo-tratamiento (Tabla 4.3). En la comparación de medias se pudieron observar a los 21 días de exposición valores de IA significativamente mayores (~3 veces) en el control que en los microcosmos tratados (Fig. 4.11). El IA tendió a incrementarse significativamente (~2,5 veces) en ambos tratamientos a los 14 días de iniciado el experimento con respecto a los tiempos anteriores. Entre los 14 y los 21 días de exposición en los microcosmos tratados, se observó una disminución del IA, aunque no fue estadísticamente significativa, pero durante este período se observó un aumento del 38% en el IA en los controles. El aumento en el IA en los microcosmos control en el último muestreo con respecto al día 0 fue de casi el doble (Fig. 4.11).

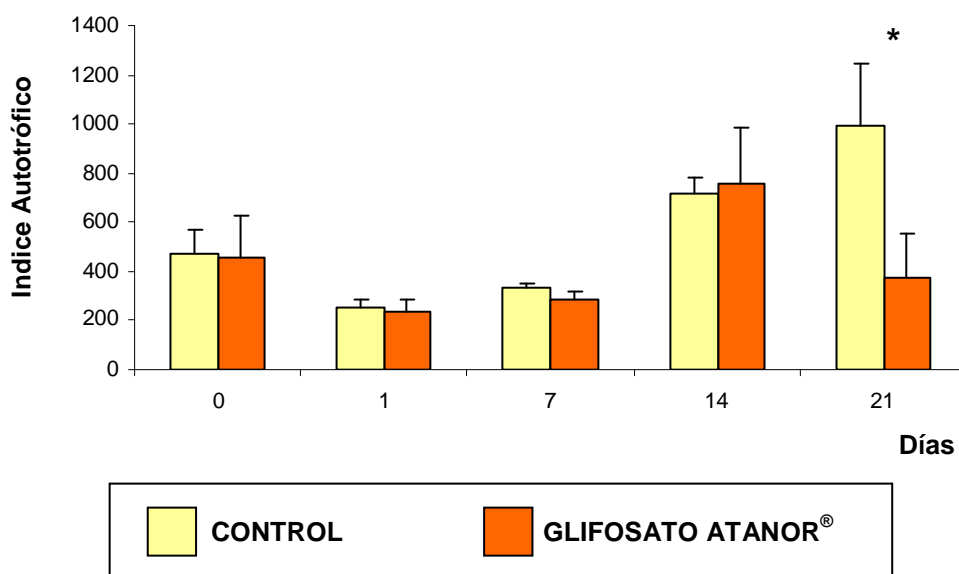


Fig. 4.11. Valores promedio del índice autotrófico en los tratamientos control y tratados durante la experiencia. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

La viabilidad celular (actividad metabólica) periférica medida como actividad mitocondrial (AM) presentó un promedio general de $4,40 \pm 1,61$ AM/mg PSLC para toda la experiencia, con un rango de valores entre 1,82 y 9,00 AM/mg PSLC. Esta variable mostró diferencias significativas en la interacción tratamiento-tiempo (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.3) y la comparación de medias reveló valores significativamente mayores en presencia del herbicida en relación al control en el tiempo t4 (Fig. 4.12). También se detectaron diferencias significativas en la actividad mitocondrial entre los tiempos en ambos tratamientos, para lo cual las comparaciones múltiples revelaron una disminución significativa de la viabilidad celular en el control al t3 y un aumento significativo al t4 en el tratamiento con herbicida (Fig. 4.12).

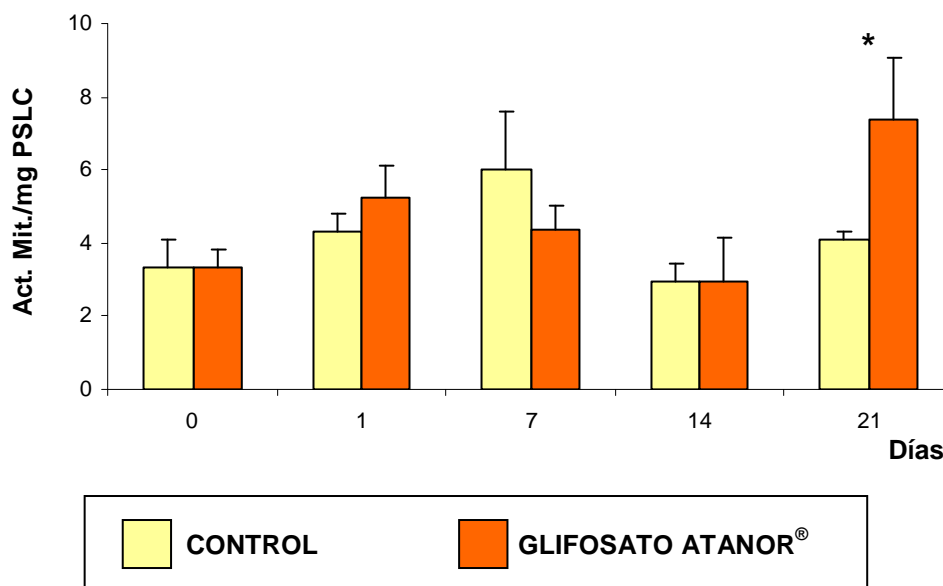


Fig. 4.12. Viabilidad celular media del perifiton medida como actividad mitocondrial por mg de peso seco libre de cenizas (PSLC) a lo largo del tiempo en los tratamientos sin y con Glifosato Atanor®. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

El estrés oxidativo evaluado según el contenido de malondialdehído (MDA) relativizado por el PSLC varió entre 0,43 y 1,58 nmoles MDA/g PSLC y entre 0,45 y 3,08 nmoles/g PSLC, en los microcosmos control y tratados, respectivamente. Esta variable, que mide el daño a lípidos, mostró diferencias significativas entre los tiempos y en la interacción (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.3). Se observó un comportamiento similar en el contenido de MDA para ambos tratamientos hasta los 14 días de iniciada la experiencia, sin embargo en la última fecha de muestreo se detectó un aumento significativo en los microcosmos tratados (Fig. 4.13). Se registró un incremento significativo de la concentración de MDA al t4 con respecto al t3 en los microcosmos con Glifosato Atanor®, indicando daño a lípidos en la comunidad tratada (Fig. 4.13).

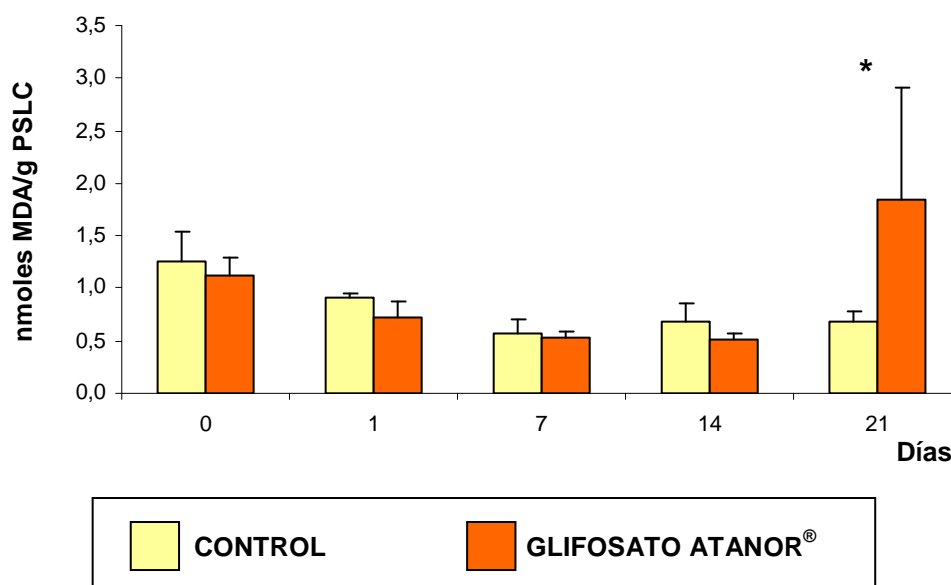


Fig. 4.13. Concentración media de malondialdehído (MDA) por gramo de peso seco libre de cenizas (PSLC) a lo largo del tiempo en los microcosmos control y tratados con Glifosato Atanor®. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

Efectos sobre el fitoplancton y el bacterioplancton

La abundancia del fitoplancton (micro- y nanoplancton) varió entre $1,77 \times 10^3$ y $6,25 \times 10^4$ individuos/ml y entre $1,13 \times 10^3$ y $1,59 \times 10^5$ individuos/ml, en los microcosmos sin y con herbicida, respectivamente. Se registraron diferencias significativas en la abundancia fitoplanctónica entre los tratamientos, entre los tiempos y en la interacción (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.4). La comparación de medias arrojó diferencias significativas entre los tratamientos al t2, con valores mayores de abundancia en el tratamiento con herbicida. En los microcosmos tratados con el pesticida se observó un aumento significativo de la abundancia fitoplanctónica a los 7 días de iniciado el experimento, la cual disminuyó significativamente a los 14 días. En los controles también se detectó un decrecimiento significativo de la densidad del fitoplancton al t3 con respecto a los tiempos anteriores (Fig. 4.14).

VARIABLE	EFECTO		
	Tratamiento	Tiempo	Trat. x Tiempo
Fito total	0,007	0,000	0,001
Verdes fito	0,007	0,000	0,001
Ciano fito	0,062	0,000	0,013

Picy	0,000	0,000	0,000
Bact	0,001	0,007	0,000
Chl a	0,086	0,543	0,025

Tabla 4.4. Niveles de significancia de los ANOVA MR para los efectos del tratamiento, el tiempo y la interacción tratamiento-tiempo en los microcosmos control y tratados en los 5 tiempos para las abundancias del micro- y nanofitoplancton: total (Fito total), de Chlorophyta (Verdes fito) y de Cyanobacteria (Ciano fito), las abundancias de picocianobacterias (Picy) y de bacterias (Bact) y la concentración de clorofila a fitoplanctónica (Chl a). Valores de $p < 0,05$ están indicados en rojo.

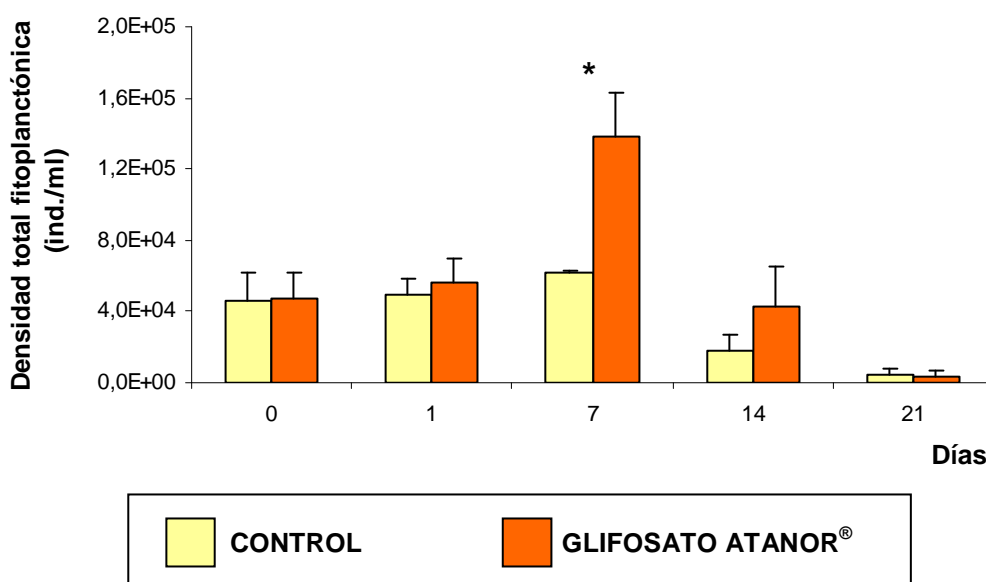
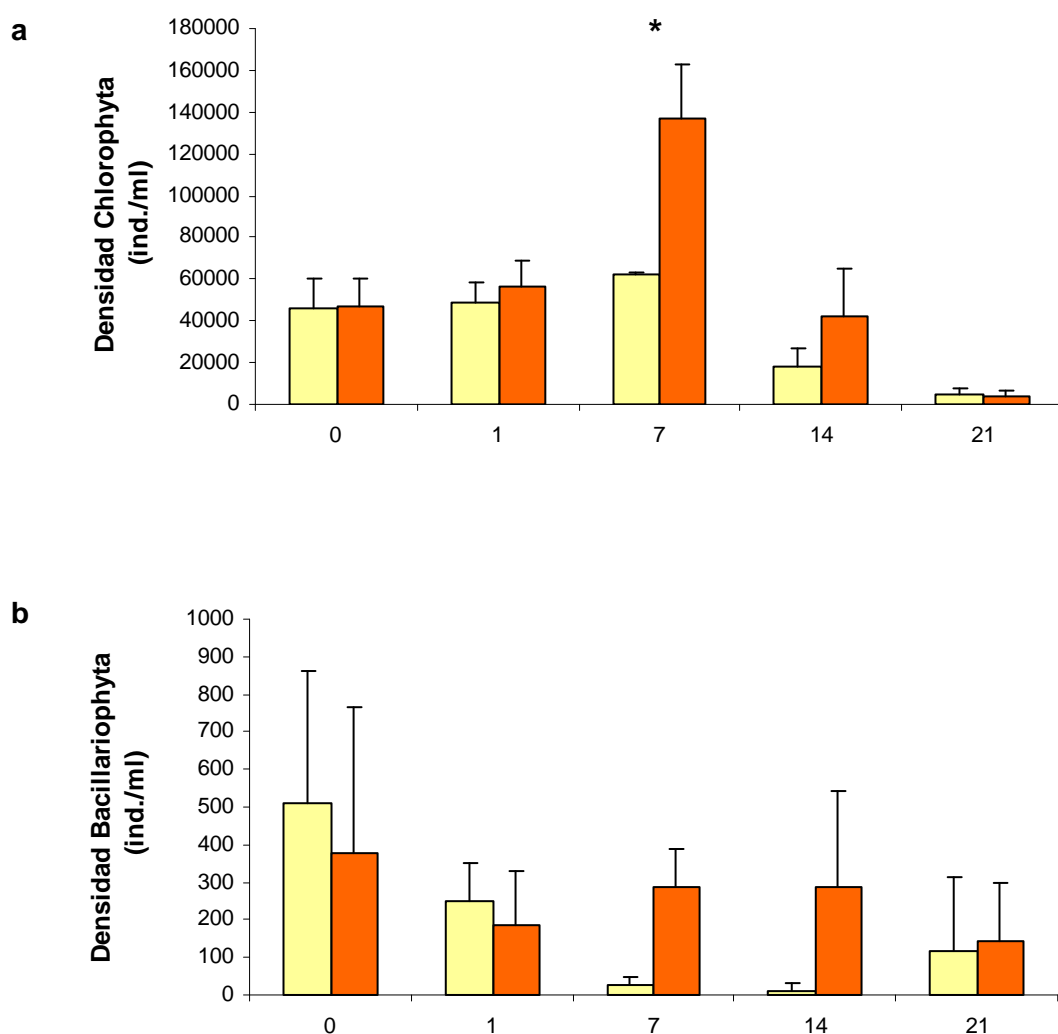


Fig. 4.14. Densidad total fitoplanctónica (micro- y nanofitoplancton) promedio para el estudio en ambos tratamientos. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

El rango de valores de densidad de las Chlorophyta fitoplanctónicas estuvo entre 1.774 y 62.413 individuos/ml y entre 804 y 158.438 ind./ml y el de las cianobacterias fluctuó entre 0 y 459 ind./ml y entre 0 y 759 ind./ml, en los microcosmos sin y con herbicida, respectivamente. La densidad de Bacillariophyta varió entre 0 y 918 ind./ml a lo largo de todo el estudio. Las Euglenophyta y Dinophyta registraron escasos representantes durante la experiencia en ambos tratamientos. En la figura 4.15 se observa la preponderancia de la densidad de algas verdes en ambos tratamientos y en todas las fechas de muestreo. No se registraron diferencias

significativas para la densidad de diatomeas fitoplanctónicas para ninguno de los factores (ANOVA MR, $p > 0,05$). La densidad de algas verdes mostró diferencias significativas en la interacción tiempo-tratamiento (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.4), presentando valores mayores en el tratamiento con adición de herbicida con respecto al control al tiempo t2 (Fig. 4.15a). En los microcosmos control, la abundancia de algas verdes fitoplanctónicas disminuyó significativamente a los 14 días, en contraposición al tratamiento con Glifosato Atanor[®], en el que se registró un aumento significativo de la abundancia de estas algas al t2 que luego disminuyó al t3. El ANOVA MR arrojó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos y en la interacción para la densidad de cianobacterias (Tabla 4.4). Esta variable mostró en ambos tratamientos un patrón similar a lo largo del tiempo, observándose una disminución significativa de la densidad a partir del t1 en los microcosmos con formulado y a partir del t2 en los controles (Fig. 4.15c).



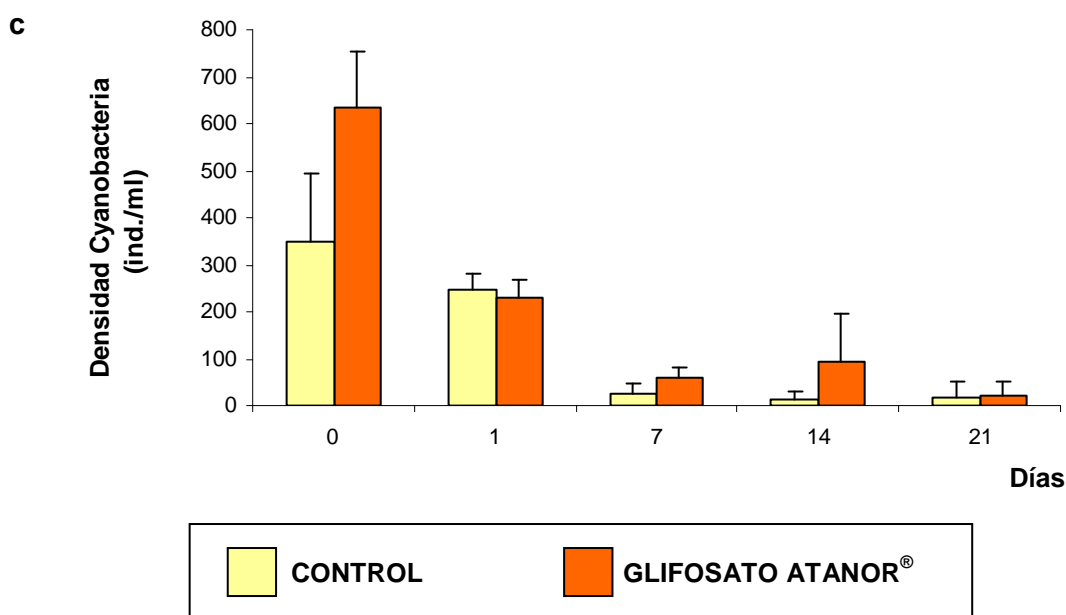


Fig. 4.15. Densidad promedio de algas fitoplanctónicas de los grupos **(a)** Chlorophyta, **(b)** Bacillariophyta y **(c)** Cyanobacteria a lo largo del estudio en los microcosmos control y tratados con Glifosato Atanor®. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

La abundancia de picocianobacterias (picy) a lo largo de la experiencia osciló entre $5,05 \times 10^4$ y $2,67 \times 10^5$ células/ml. La abundancia de picy registró diferencias significativas entre tratamientos, tiempos y en la interacción tiempo-tratamiento (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.4). La comparación de medias mostró diferencias significativas entre tratamientos, con valores en los microcosmos tratados siempre por sobre los controles, a partir de los 7 días de exposición al Glifosato Atanor®. Las diferencias en la abundancia media de picy entre los tratamientos mostró un máximo a los 14 días con un valor un 140% mayor en los microcosmos tratados con herbicida (Fig. 4.16a). También se registraron diferencias entre los tiempos para ambos tratamientos. El análisis de las picy en los microcosmos control a lo largo del tiempo mostró una disminución significativa (50%) de la abundancia en la primer semana de la experiencia para aumentar en forma significativa a los 21 días, hasta valores similares a los del día 0. En los microcosmos con formulado, la abundancia media de picy mostró un aumento significativo de ~2 veces a los 14 días de exposición, valor que se mantuvo constante hasta la última fecha de muestreo (Fig 4.16a). El otro grupo de organismos del picoplancton autotrófico, las picoeucariotas, estuvieron prácticamente ausentes en las muestras de agua de los microcosmos de ambos

tratamientos. La abundancia media de las bacterias heterotróficas fue de $4,23 \times 10^6 \pm 6,81 \times 10^5$ células/ml y de $5,96 \times 10^6 \pm 1,68 \times 10^6$ células/ml, en los microcosmos control y tratados, respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre los tiempos, los tratamientos y en la interacción tiempo-tratamiento para la abundancia de bacterias (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.4). Comparando las medias se registraron diferencias significativas entre los tratamientos a partir del primer día del experimento, con densidades de bacterias siempre mayores en los microcosmos tratados. Las diferencias de abundancias entre los tratamientos fueron aproximadamente entre un 30% y un 110% más altas en los microcosmos con herbicida entre el día 1 y 21 de exposición (Fig. 4.16b). El control se mantuvo constante en el tiempo, sin embargo en los microcosmos tratados se registró un aumento significativo desde el primer día de la experiencia, que se mantuvo sin variaciones hasta la última fecha (Fig. 4.16b).

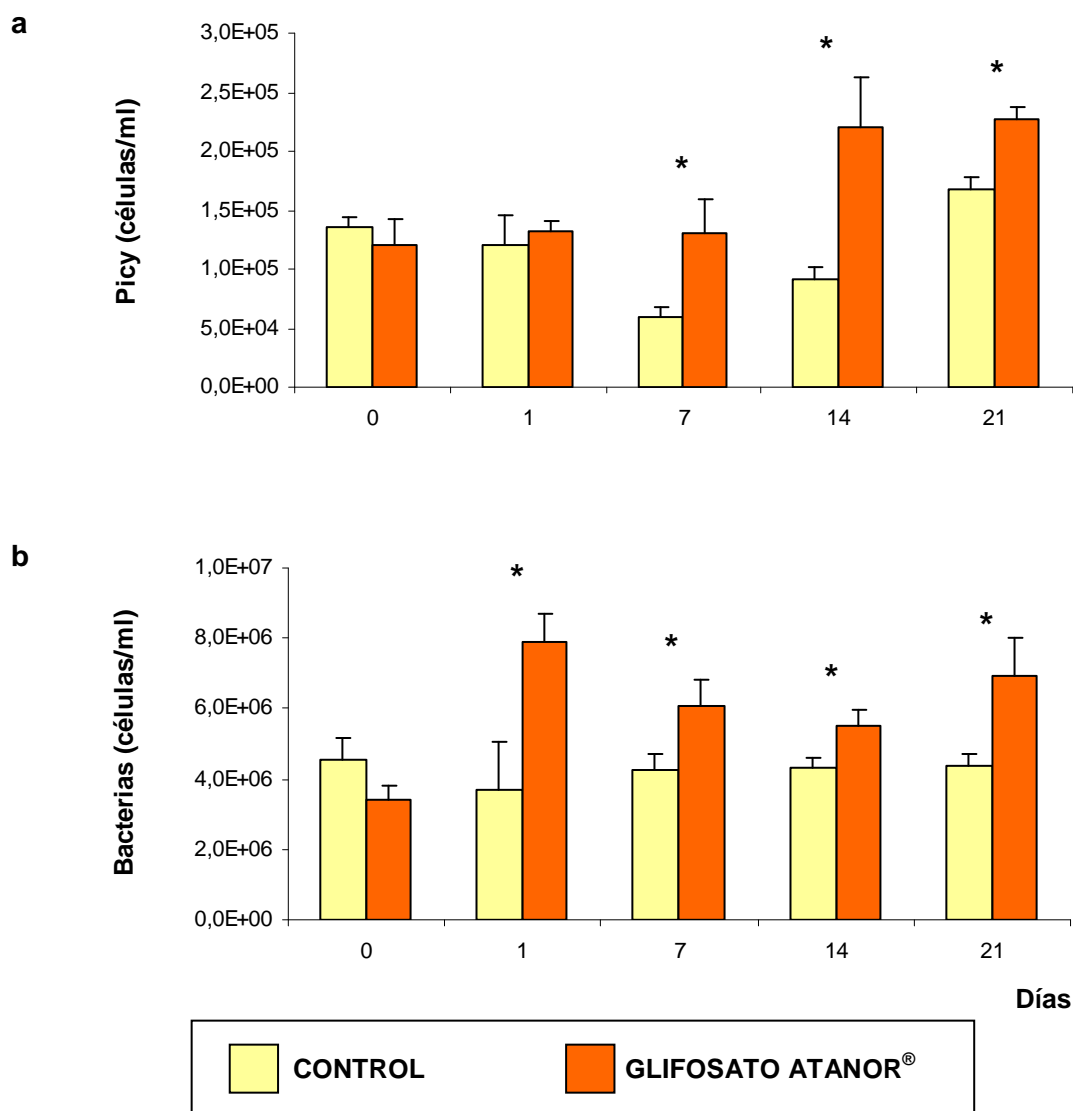


Fig. 4.16. Abundancia media de **(a)** picocianobacterias (picy) y **(b)** bacterioplancton a lo largo de la experiencia en los microcosmos control y tratados con Glifosato Atanor®. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

La concentración de clorofila *a* fitoplanctónica varió entre 0,87 y 12,64 µg/litro y entre 4,50 y 39,19 µg/l en los microcosmos control y tratados, respectivamente y se observaron diferencias significativas en la interacción tiempo-tratamiento (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 4.4). La comparación de medias registró diferencias significativas entre los tratamientos al t1 y t2; y aunque se observaron grandes diferencias a los tiempos t3 y t4 no son significativas debido a la gran variabilidad entre las réplicas en el tratamiento con herbicida (Fig. 4.17). También se registraron diferencias entre los tiempos, únicamente en el tratamiento control, observándose una disminución significativa de la Chl *a* fitoplanctónica a partir de los 14 días de la experiencia. En los microcosmos tratados, aún cuando la tendencia es claramente observable, no se registraron diferencias significativas a lo largo del tiempo, sin embargo se observó un aumento de la concentración de Chl *a* a partir de la primer semana de exposición (Fig. 4.17).

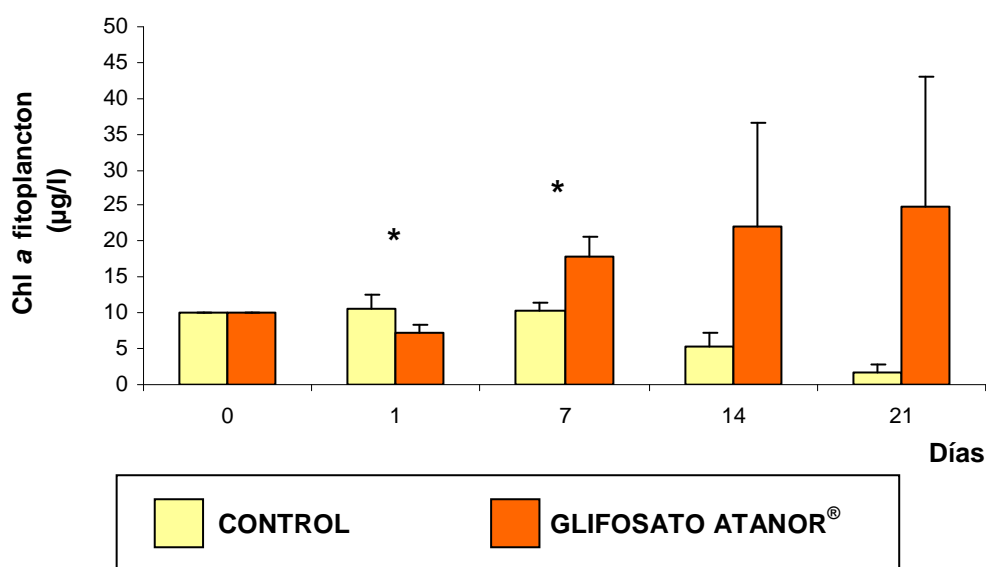


Fig. 4.17. Concentración media de clorofila *a* fitoplanctónica a lo largo del estudio en los microcosmos control y tratados con Glifosato Atanor®. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

Efectos sobre el zooplancton

La abundancia total del zooplancton al t0 fue de 346 individuos/litro con una clara dominancia de copépodos (Fig. 4.18), de los cuales más del 98% estaba representado por larvas nauplii de calanoideos (Fig. 4.19a). Se registraron valores promedio (\pm DE) de la densidad total de zooplancton significativamente similares (ANOVA 1 factor, $p > 0,05$) al tiempo final en los microcosmos sin y con herbicida, 328 ± 10 y 328 ± 55 ind./litro respectivamente. La densidad de copépodos en los microcosmos de ambos tratamientos al t4 fue significativamente menor que al t0, observándose al t4 en los controles valores significativamente mayores con respecto a los microcosmos tratados (ANOVA 1 factor, $p < 0,05$, Fig. 4.18). Se determinaron dos órdenes de copépodos, Calanoida y Cyclopoida, y se distinguieron los organismos adultos de los nauplii (Fig. 4.19a). No se registraron diferencias significativas entre los microcosmos sin y con herbicida para los Cyclopoida adultos ni para los nauplii al t4. Sin embargo, sí se detectó un aumento significativo de la densidad de calanoideos adultos al tiempo final con respecto al inicial en ambos tratamientos, registrándose valores de densidad significativamente mayores en los controles al t4 (ANOVA 1 factor, $p < 0,05$, Fig. 4.19a). Con respecto a los calanoideos nauplii, se obtuvieron densidades significativamente menores en ambos microcosmos al t4 con respecto a t0 (ANOVA 1 factor, $p < 0,05$), pero sin diferencias significativas entre los tratamientos a tiempo final (ANOVA 1 factor, $p > 0,05$, Fig. 4.19a).

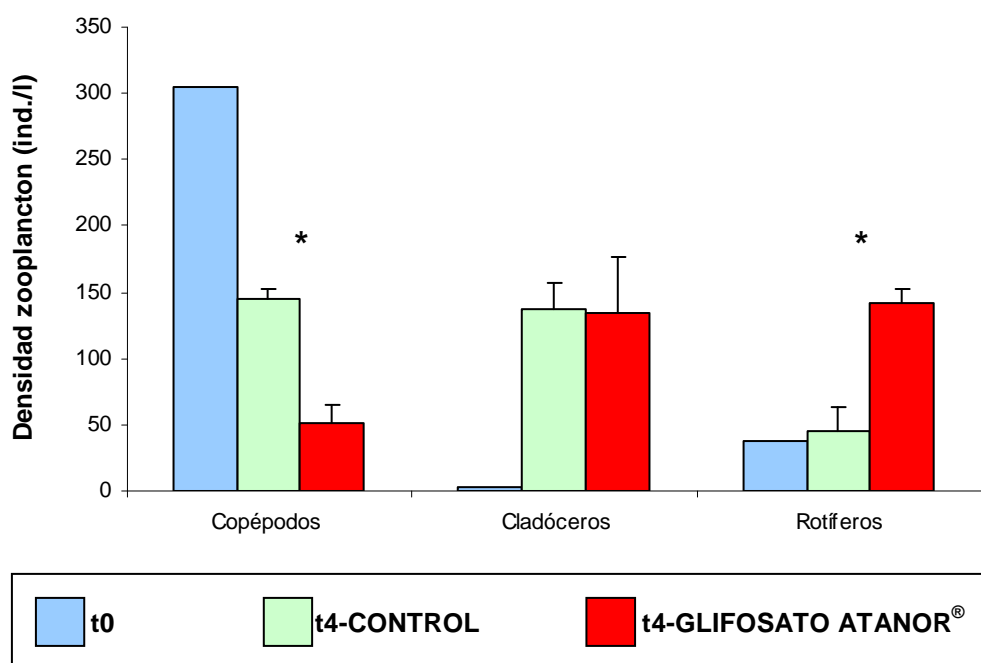
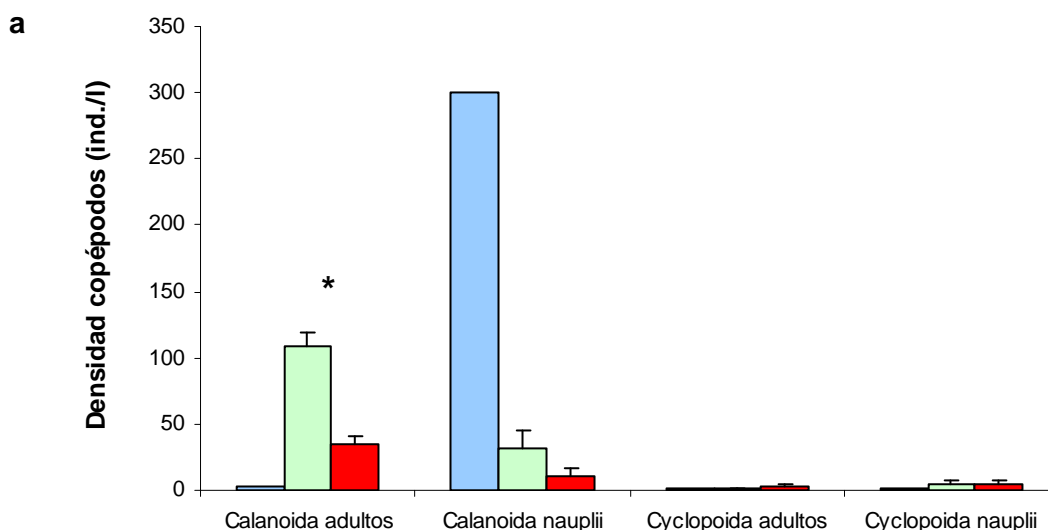


Fig. 4.18. Densidad total de los distintos grupos del zooplancton a tiempo inicial y en los microcosmos control y tratados a tiempo final (media + 1 desvío estándar).

Diferencias significativas entre los tratamientos al tiempo t4 están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

La densidad total de cladóceros presentó valores significativamente mayores al t4 con respecto al t0, tanto en el control como en los microcosmos con herbicida, y la abundancia de cladóceros al t4 fue similar en ambos tratamientos (ANOVA 1 factor, $p > 0,05$). Para los cladóceros se identificaron dos géneros, *Alona* spp. y *Moina* spp. y sólo se detectó un aumento significativo de *Moina* spp. a los 21 días con respecto al día 0, pero sin diferencias entre los tratamientos (Fig. 4.19b). La abundancia de rotíferos en los microcosmos control al t4 fue significativamente similar que al t0 (ANOVA 1 factor, $p > 0,05$). En los microcosmos tratados con formulado al t4 se observaron valores significativamente mayores con respecto tanto al t0 como a los controles a tiempo final (ANOVA 1 factor, $p < 0,05$) (Fig. 4.18). Dentro de los rotíferos determinados, sólo el género *Lecane* presentó diferencias significativas entre los tratamientos al t4 (ANOVA 1 factor, $p < 0,05$, Fig. 4.19c), siendo la densidad de este género más de 20 veces mayor en los microcosmos tratados. En la última fecha de muestreo se registraron grandes cantidades de larvas de quironómidos en ambos tratamientos, que se encontraban ausentes al tiempo inicial. Al t4 la densidad de estas larvas fue similar en ambos tratamientos (ANOVA 1 factor, $p > 0,05$), con valores promedio (\pm DE) de 48 ± 16 ind./litro en los controles y de 51 ± 5 ind./l en los microcosmos con adición de herbicida.



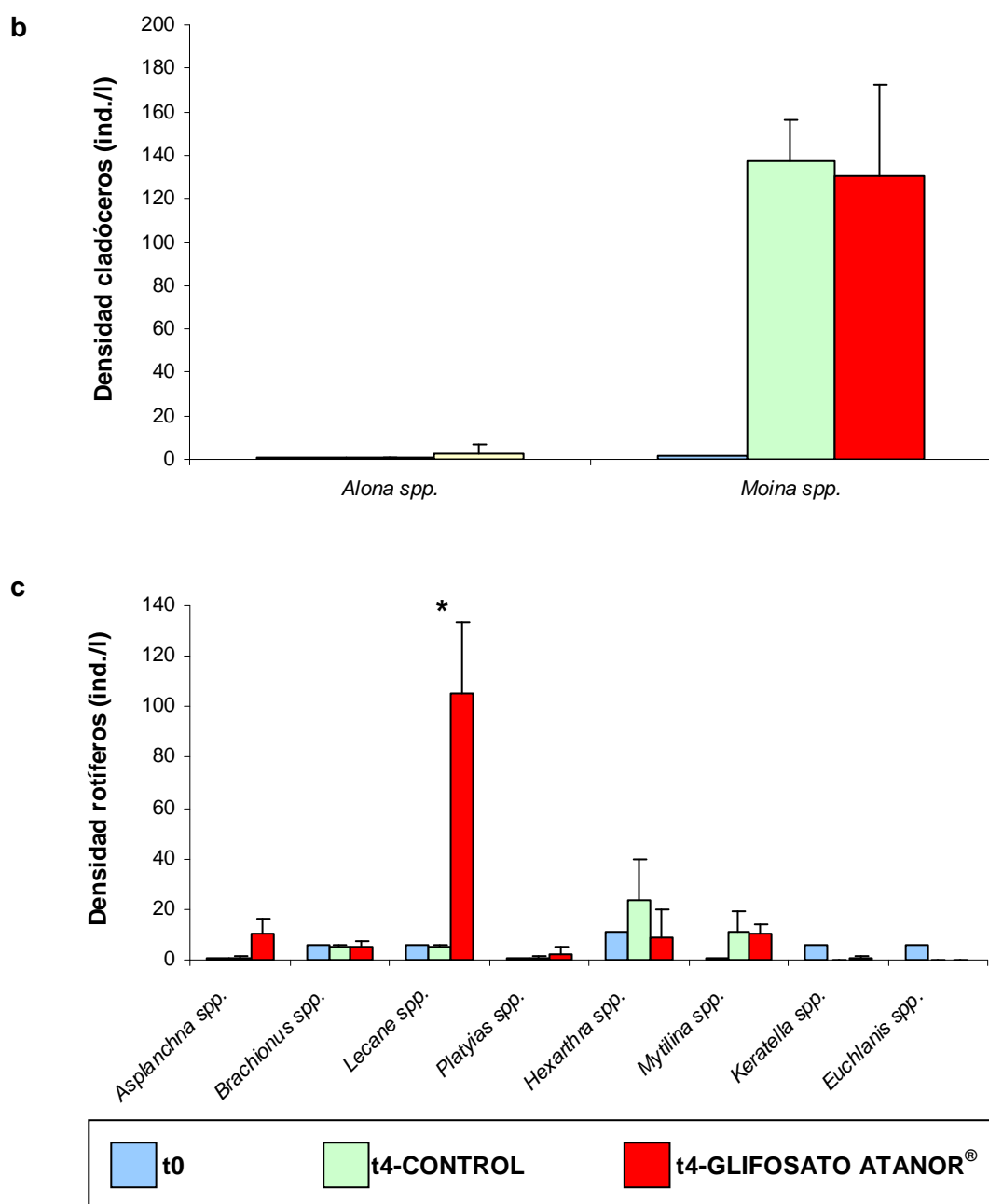


Fig. 4.19. Densidad de (a) copépodos, (b) cladóceros y (c) rotíferos al tiempo inicial y en los microcosmos control y tratados al tiempo final. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos al tiempo t4 están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

Características del agua de los microcosmos

Al inicio del experimento (t0), los seis microcosmos presentaban similares características limnológicas, ya que fueron llenados con el agua del tanque de mayor capacidad e inmediatamente después se dio comienzo al experimento.

CAPÍTULO 4: Impacto en comunidades microbianas en microcosmos

Al comienzo del experimento (t0), el agua era alcalina, con alto pH ($8,97 \pm 0,01$) y alta conductividad ($4,05 \pm 0,02$ mS/cm a 21°C). La temperatura media del agua al t0 fue de $27,22 \pm 0,16$ °C, la concentración de oxígeno disuelto 4,50 mg/litro y la turbidez nefelométrica 2,75 NTU.

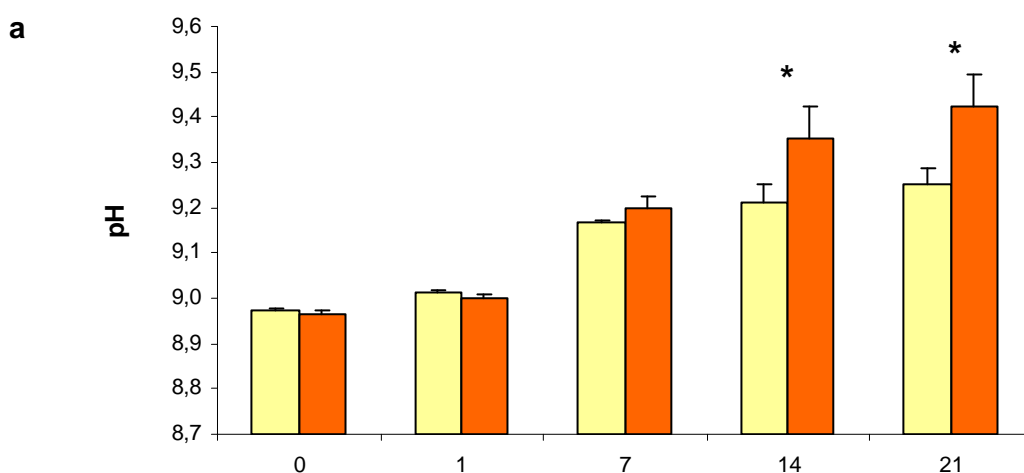
Las concentraciones iniciales de nutrientes no mostraron valores limitantes para el crecimiento algal siendo la concentración de fósforo total de 76,00 µg/litro y la de nitrógeno total 4308,99 µg/l. En la Tabla 4.5 se encuentran resumidas las características físico-químicas del agua de los microcosmos, iniciales y durante la experiencia en ambos tratamientos.

PARÁMETRO	INICIAL (t0)	CONTROL (t1-t4)	GLIFOSATO ATANOR® (t1-t4)
Temperatura (°C)	$27,22 \pm 0,16$	$23,13 \pm 1,87$	$23,23 \pm 1,92$
pH	$8,97 \pm 0,01$	$9,16 \pm 0,10$	$9,24 \pm 0,18$
Conductividad (mS/cm)	$4,05 \pm 0,02$	$4,05 \pm 0,31$	$3,90 \pm 0,45$
O ₂ disuelto (mg/l)	$4,50 \pm 0,00$	$7,37 \pm 1,27$	$8,67 \pm 1,93$
Turbidez (NTU)	$2,75 \pm 0,00$	$1,96 \pm 0,71$	$3,86 \pm 1,73$
FT (µg/l)	$76,00 \pm 0,00$	$61,33 \pm 17,00$	$1194,33 \pm 242,99$
FRS (µg/l)	$8,57 \pm 0,00$	$23,94 \pm 11,01$	$22,86 \pm 6,78$
NT (µg/l)	$4308,99 \pm 0,00$	$2268,83 \pm 615,77$	$2779,90 \pm 1084,23$
NO (µg/l)	$3707,20 \pm 0,00$	$1731,33 \pm 436,69$	$2384,67 \pm 955,16$
N-NH ₄ ⁺ (µg/l)	$0,00 \pm 0,00$	$1,99 \pm 3,63$	$0,92 \pm 1,70$
N-NO ₂ ⁻ (µg/l)	$27,94 \pm 0,00$	$28,18 \pm 3,80$	$17,30 \pm 12,32$
N-NO ₃ ⁻ (µg/l)	$573,00 \pm 0,00$	$509,32 \pm 248,89$	$377,94 \pm 402,62$
STS (mg/l)	$7,80 \pm 0,00$	$4,54 \pm 1,95$	$10,72 \pm 4,98$
MO (mg/l)	$6,40 \pm 0,00$	$3,52 \pm 1,54$	$8,95 \pm 4,45$

Tabla 4.5. Características físico-químicas promedio (\pm desvío estándar) al inicio del experimento (t0) para todos los microcosmos y a lo largo del experimento (t1-t4, promedio desde los días 1 al 21) para los microcosmos control y tratados con Glifosato Atanor®.

A lo largo del experimento, la temperatura del agua registró el menor valor (21,30°C) en el último muestreo y el mayor (27,40°C) en el t0. La temperatura no varió significativamente entre tratamientos, pero sí entre todos los tiempos de muestreo para ambos tratamientos. El pH promedio durante la experiencia fue de $9,16 \pm 0,16$. Los

mayores valores de pH, 9,29 y 9,47, se registraron en la última fecha de muestreo, en los microcosmos sin y con herbicida, respectivamente. El pH mostró diferencias significativas entre los tratamientos, los tiempos y en la interacción tiempo-tratamiento (ANOVA MR, $p < 0,05$, Fig. 4.20a). Las comparaciones de medias registraron diferencias significativas entre los tratamientos en los días 14 y 21 del experimento, con valores de pH mayores en los microcosmos con Glifosato Atanor® en ambas fechas, y se registraron diferencias significativas entre los tiempos para ambos tratamientos. Las dos primeras fechas de muestreo mostraron diferencias significativas con los tiempos t2, t3 y t4 en ambos tratamientos. Además, se registró, en los microcosmos tratados, un aumento estadísticamente significativo del pH entre el día 7 y los 14 y 21 días (Fig. 4.20a). La concentración promedio de oxígeno disuelto a lo largo de la experiencia fue de $6,80 \pm 1,64$ mg/litro y de $7,84 \pm 2,43$ mg/l para los microcosmos control y tratados, respectivamente. Se registraron diferencias significativas entre los tratamientos, los tiempos y en la interacción tiempo-tratamientos para el contenido de O₂ en el agua de los microcosmos (ANOVA MR, $p < 0,05$, Fig. 4.20b). La comparación de medias mostró diferencias entre los tratamientos a partir del primer día de exposición al herbicida, con valores levemente menores (4%) el día 1 y aproximadamente 1,25 mayores del día 7 al día 21, en los microcosmos con Glifosato Atanor®. Se registraron diferencias en el contenido de O₂ entre todos los tiempos para el tratamiento control, y se detectó un aumento significativo del O₂ disuelto hasta la primer semana, se mantuvo constante hasta los 14 días y luego sufrió una disminución del 34% en la última fecha de muestreo en los microcosmos tratados. Los menores valores de O₂ se registraron en el día inicial de la experiencia (Fig. 4.20b).



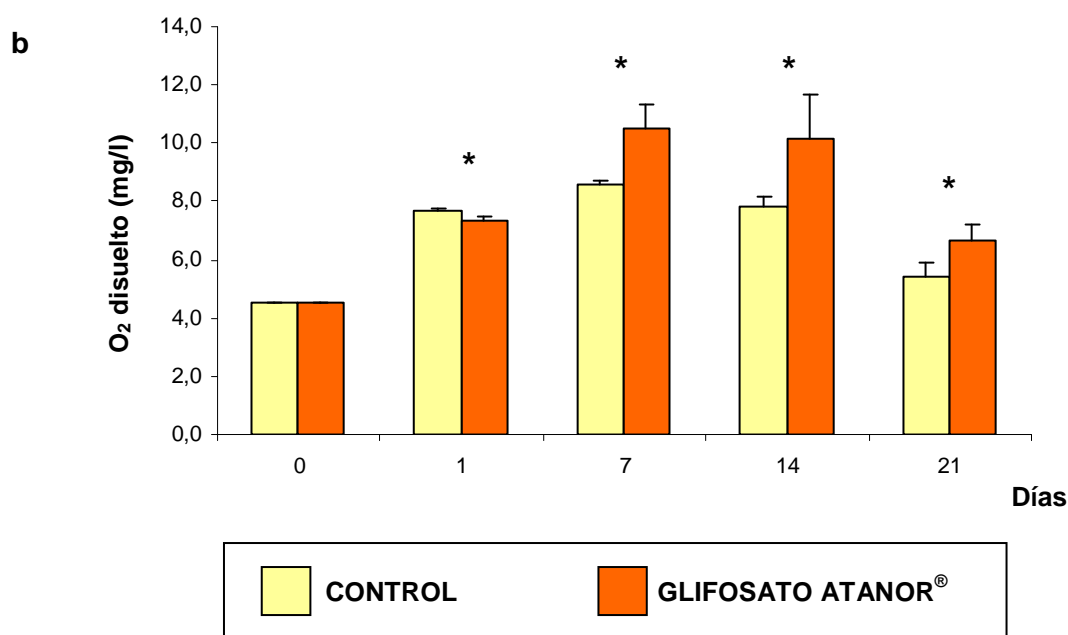


Fig. 4.20. Valores promedio de (a) pH y (b) oxígeno disuelto en los microcosmos control y tratados con Glifosato Atanor® a lo largo del estudio. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

La conductividad media de todo el experimento fue de $3,99 \pm 0,35$ mS/cm, con los menores valores, 3,42 y 3,05 mS/cm, a los 21 días y los mayores, 4,44 y 4,28 mS/cm, a los 7 días, en los microcosmos sin y con herbicida, respectivamente. El ANOVA MR registró diferencias estadísticamente significativas entre tiempos, tratamientos y en la interacción tiempo-tratamiento ($p < 0,05$, Fig. 4.21a). Si bien los valores de conductividad estaban dentro del mismo orden de magnitud, en todos los tiempos se observaron valores de conductividad levemente mayores en los controles. Se registraron diferencias significativas a los 14 y 21 días de la experiencia entre los tratamientos. En ambos tratamientos, se registró un aumento significativo de la conductividad a los 7 días, que se mantuvo constante hasta la segunda semana, para luego sufrir una disminución significativa a los 21 días (Fig. 4.21a). La turbidez nefelométrica en los controles promedió los $2,12 \pm 0,71$ NTU, fluctuando entre 1,17 y 3,23 NTU y en los microcosmos con Glifosato Atanor® el promedio de Tn fue de $3,64 \pm 1,6$ NTU, con un rango de variación entre 1,39 y 7,38 NTU. En todos los tiempos de muestreo de la experiencia, se observaron valores de turbidez mayores en los microcosmos tratados con respecto a los controles (Fig. 4.21b). No se observaron diferencias significativas en la Tn para ninguno de los efectos (ANOVA MR, $p > 0,05$),

sin embargo, a la semana de iniciado el experimento, se observó una marcada disminución de la Tn en los controles y un aumento en los microcosmos tratados.

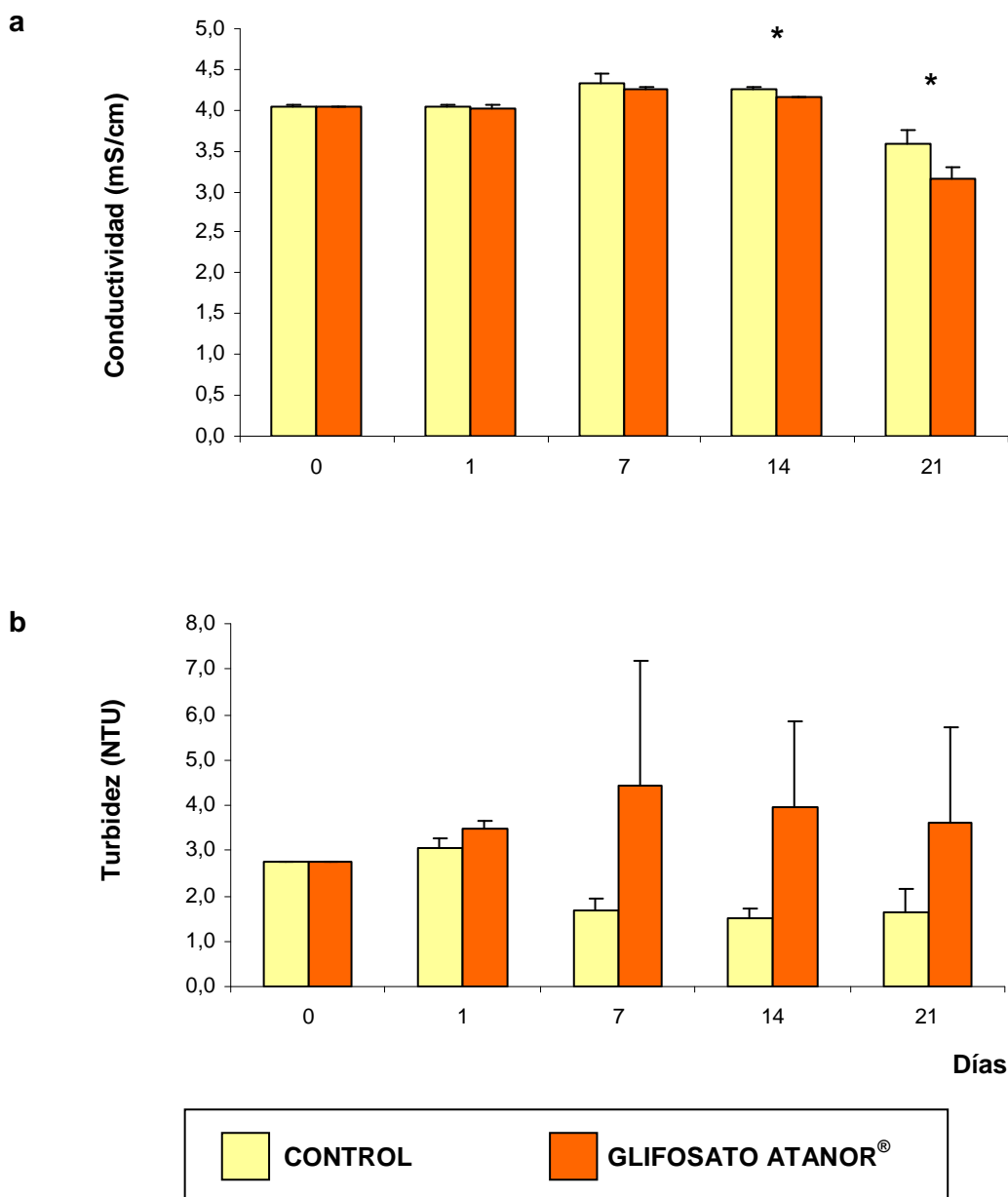


Fig. 4.21. Valores promedio de **(a)** conductividad y **(b)** turbidez nefelométrica en ambos tratamientos a lo largo de la experiencia. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

A partir del t1, el rango de concentración de fósforo total estuvo entre 32 y 90 $\mu\text{g P/l}$ y entre 922 y 1564 $\mu\text{g P/l}$ en los microcosmos control y con herbicida, respectivamente. La fracción principal de FT en los microcosmos con Glifosato Atanor®

fue la fracción soluble, entre el 55,9% y el 99,5% del FT. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos, tiempos y en la interacción tiempo-tratamiento para el FT (ANOVA MR, $p < 0,05$, Fig. 4.22). A partir del t1, los microcosmos con adición de herbicida mostraron valores significativamente mayores de FT, entre 10 y 30 veces mayores, que los valores control. A los 14 días de la experiencia, se registró una disminución significativa del FT en los microcosmos control, en cambio en los tratados con Glifosato Atanor[®] se registró un aumento significativo, seguido de una leve disminución a las 3 semanas de exposición (Fig. 4.22). A partir del día 1 del experimento, el rango de concentraciones del fósforo reactivo soluble estuvo entre 3,00 y 40,00 $\mu\text{g/litro}$ y entre 10,00 y 32,86 $\mu\text{g/litro}$, en los microcosmos sin y con herbicida, respectivamente. El FRS sólo mostró diferencias significativas entre los tiempos (ANOVA MR, $p < 0,05$), con un aumento significativo hasta la primer semana de exposición para luego sufrir una disminución a la segunda semana.

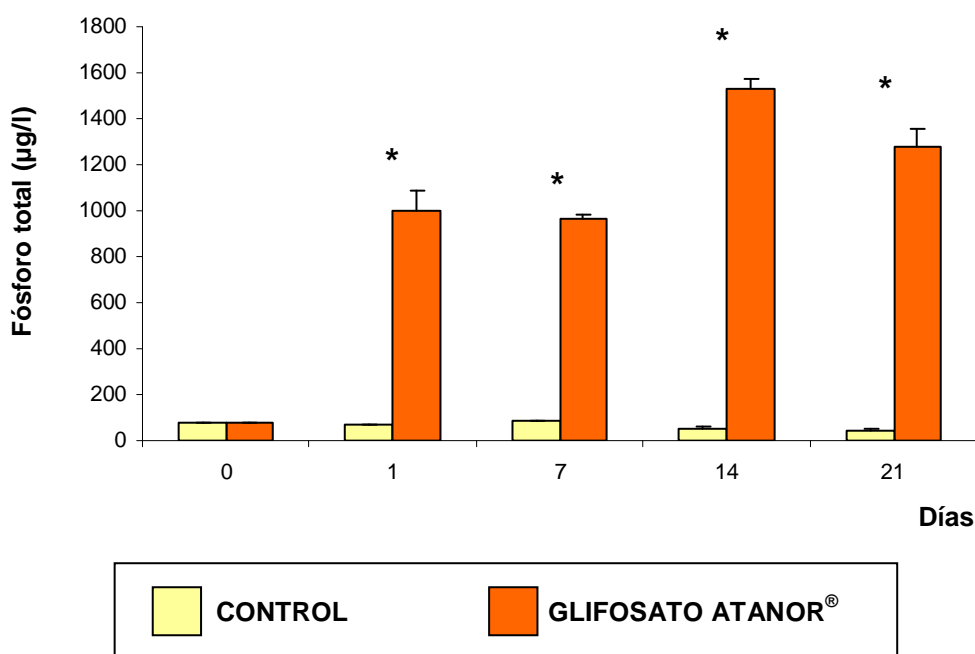


Fig. 4.22. Concentración media de fósforo total a lo largo del tiempo que duró la experiencia para los microcosmos control y tratados. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

Los rangos de concentración a partir del día 1 del experimento fueron de 1056,37 a 4809,86 $\mu\text{g/l}$ para el nitrógeno total y de 1008,00 a 4592,00 $\mu\text{g/l}$ para el nitrógeno orgánico. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de NT y NO entre los tratamientos pero sí fueron variables en el tiempo (ANOVA MR,

$p < 0,05$). Los mayores valores promedio de ambas variables se registraron al t0 (Tabla 4.5) y posteriormente se registró una disminución significativa a los días 1 y 21. A tiempo final (t4), la reducción en las concentraciones de NT y NO fue de alrededor del 50% con respecto al t3 y del 65% con respecto al t0.

El contenido de amonio en el agua de los microcosmos varió entre 0,00 y 11,17 $\mu\text{g N/litro}$ y entre 0,00 y 4,50 $\mu\text{g N/l}$ en los microcosmos sin y con Glifosato Atanor[®], respectivamente. La concentración de amonio mostró diferencias significativas en la interacción tratamiento-tiempo (ANOVA MR, $p < 0,05$). La comparación de medias reveló diferencias significativas entre tratamientos a los tiempos t1 y t4. Al día 1, la concentración de N-NH_4^+ fue significativamente menor en los controles, en cambio al día 21, fue menor en los microcosmos con formulado de glifosato. Para el tratamiento control, se detectó un aumento significativo del amonio en la última fecha de muestreo, por el contrario en el tratamiento con herbicida, el aumento se detectó en el primer día de exposición y luego mostró una disminución significativa a los 7 días que se mantuvo constante el resto de la experiencia.

Las concentraciones de nitritos fluctuaron entre 23,09 y 36,51 $\mu\text{g/litro}$ y entre 1,37 y 34,23 $\mu\text{g/l}$ y las de nitratos entre 233,06 y 904,77 $\mu\text{g/l}$ y entre 2,20 y 1131,91 $\mu\text{g/l}$ en los microcosmos control y tratados, respectivamente. Se detectaron diferencias significativas en el tiempo, los tratamientos y en la interacción tiempo-tratamiento para los nitritos y los nitratos (ANOVA MR, $p < 0,05$). Las comparaciones de medias revelaron diferencias significativas entre los tratamientos, concentraciones control mayores que con glifosato, en la última fecha de muestreo para la concentración de N-NO_2^- y a partir del t3 para el N-NO_3^- (Fig. 4.23a, b); ambas concentraciones mostraron una diferencia de aproximadamente 20 veces entre ambos tratamientos al t4. La concentración de N-NO_2^- fue constante en el tiempo en los controles y en los microcosmos tratados se registró una disminución significativa del 95% en la última fecha de muestreo con respecto al t0 (Fig. 4.23a). Las concentraciones de N-NO_3^- en ambos tratamientos mostraron patrones similares, un aumento significativo luego del primer día de la experiencia para luego disminuir significativamente hasta los 14 días y mantenerse constantes hasta el final de la experiencia (Fig. 4.23b).

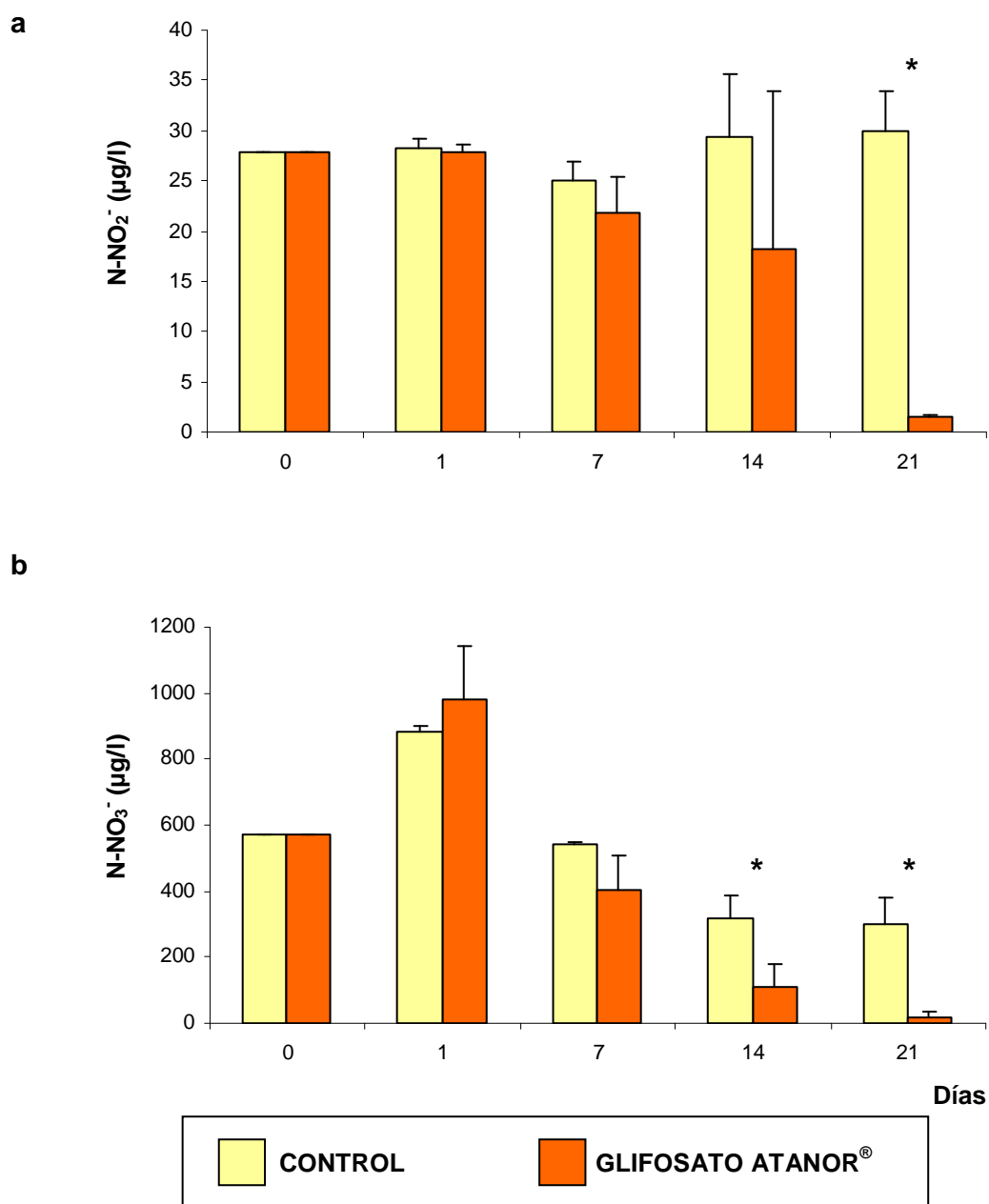


Fig. 4.23. Concentración media de **(a)** nitritos (N-NO₂⁻) y **(b)** nitratos (N-NO₃⁻) en ambos tratamientos durante todo el experimento. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre los tratamientos están indicadas con un asterisco (*, $p < 0,05$).

Los rangos de concentración de los sólidos totales en suspensión estuvieron entre 2,40 y 7,80 mg/l y entre 4,13 y 15,25 mg/l y los de la materia orgánica entre 1,80 y 6,40 mg/l y entre 3,25 y 13,00 mg/l en los tratamientos control y con herbicida, respectivamente. Los valores promedio de los STS y la MO en los controles siempre fueron menores que en los microcosmos tratados aunque no se observaron

diferencias significativas entre los tratamientos, tiempos o en la interacción tiempo-tratamiento para los STS y la MO (ANOVA MR, $p > 0,05$).

Disipación del glifosato

La concentración promedio de glifosato luego de la adición del herbicida (t_0) fue de $3,45 \pm 0,36$ mg/litro (media \pm DE). Ajustando los datos a la ecuación $C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$, con C_t = concentración al tiempo t , C_0 = concentración inicial y k = constante de disipación (Fig. 4.23), los microcosmos tratados presentaron una tasa de disipación (k) de glifosato estimada de $0,04$ días⁻¹ ($\pm 0,02$ DE) con una vida media de 16,02 días.

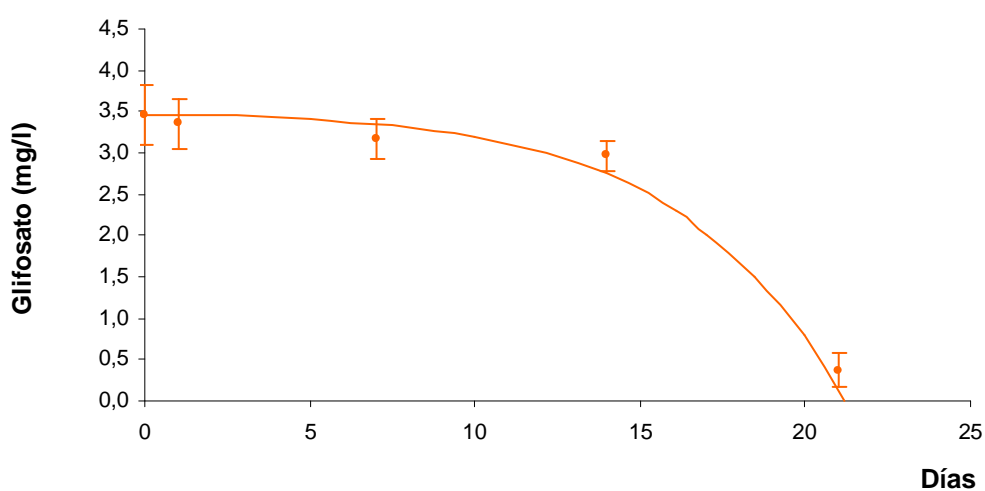


Fig. 4.23. Concentración media de glifosato a lo largo del experimento en los microcosmos tratados con Glifosato Atanor[®]. Las barras de error representan ± 1 desvío estándar.

DISCUSIÓN

En este estudio hemos podido observar que una única aplicación de Glifosato Atanor[®] produjo un rápido enturbiamiento del agua, asociado al aumento de bacterias, picocianobacterias planctónicas y cambios en algunas variables físicas y químicas, que conllevó al rápido deterioro de la calidad del agua de los microcosmos. El empeoramiento de las condiciones generales de los microcosmos tratados fue mucho más rápido que el que fuera observado en los mesocosmos luego de 1 año (Capítulo 2). En este sentido, sugerimos que de acuerdo con los resultados de este experimento una aplicación de herbicida en cuerpos de agua de menor volumen producirá más rápidas modificaciones en la ecología general de los sistemas. Esta aseveración podría estar explicada por varias razones. Una de ellas es el efecto de “confinamiento de los recursos” y concentración en los microcosmos (Brandt *et al.* 2004, Pesce *et al.* 2009, Pinhassi *et al.* 2004) que provoca una mayor disponibilidad de recursos en volúmenes menores debido al efecto morfométrico con una aceleración de los procesos funcionales totales del sistema. En los estudios en microcosmos es común observar que la productividad microbiana (autotrófica y heterotrófica) se estimula rápidamente (Pesce *et al.* 2009). El fósforo proveniente de la degradación de la molécula del glifosato estaría más rápidamente biodisponible e incorporado a la biomasa algal lo que desencadenaría cambios más veloces.

Otro aspecto a considerar en estas variaciones es que el Glifosato Atanor[®] utilizado en este ensayo estaría conteniendo un coadyuvante fosforado, lo que incorpora una mayor carga de este nutriente a los confinados microcosmos. Con el objeto de extender la perspectiva en nuestras investigaciones, en este experimento se utilizó un formulado de glifosato distinto al de los estudios anteriores, ya que decidimos usar Glifosato Atanor[®], formulado extensamente utilizado en nuestro país y con el mismo porcentaje del ingrediente activo que el Roundup[®]. Sin embargo, a diferencia del Roundup[®] que posee POEA, la composición completa del formulado Glifosato Atanor[®] es desconocida ya que se le agregan uno o más agentes tensioactivos que no se encuentran especificados en las etiquetas de las distintas partidas del producto. El agregado a los microcosmos de 3,5 mg i.a./l de glifosato contribuyó con 490 µg de fósforo/l, concentración que no es suficiente para explicar el enorme aumento de FT observado al t1. Solo un 56% del FT medido en el agua al t1 estaría explicado por el glifosato presente en el formulado y el resto debería provenir de los agentes tensioactivos que presenta el formulado Glifosato Atanor[®]. En los estudios previamente presentados en los Capítulos 1 y 3, también se registró un marcado incremento del FT en los mesocosmos tratados, sin embargo en ambos experimentos el aumento estuvo totalmente explicado por el fósforo proveniente del glifosato del

Roundup® adicionado al agua de los mesocosmos. Este hecho pone en evidencia la gran importancia que tiene saber la composición química exacta de los formulados, ya que en general los agricultores, que utilizan estos productos para incrementar el rendimiento de los cultivos, desconocen la toxicidad del herbicida para el ambiente natural. Los variados formulados comerciales pueden producir diferentes respuestas debido a que contienen diversos surfactantes que no se encuentran especificados en el marbete del producto, y en general están referidos como “inertes” o “secretos comerciales” (Lajmanovich *et al.* 2011). Por otro lado, otro aspecto que agrava aún más la situación ambiental y general, es que los formulados de la misma marca comercial pueden presentar diferentes coadyuvantes según la partida de que se trate.

Inmediatamente después de la aplicación del Glifosato Atanor® se observó una marcada tendencia al aumento de la turbidez y de los sólidos totales en suspensión, y aunque sin diferencias significativas fue siempre la fracción orgánica la preponderante en presencia del herbicida. Este hecho está claramente asociado al aumento en la densidad de las bacterias y las picocianobacterias planctónicas, y con el incremento marcado de la clorofila *a* planctónica. Una vez más, tal como fuera observado en los mesocosmos, las picocianobacterias proliferaron en presencia del formulado de glifosato. Por otro lado, el abrupto y veloz aumento de la densidad bacteriana registrado en los microcosmos enriquecidos puede ser explicado por el hecho de que las bacterias son uno de los principales organismos que pueden degradar la molécula de glifosato. En la bibliografía los resultados son variados. En un caso, nuestros resultados concuerdan con el aumento significativo a partir del primer día de exposición al Roundup® en la biomasa bacteriana de *Aeromonas* spp. y *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas de muestras de agua de un lago somero en España reportado por Amorós *et al.* (2007). En otros casos, se han mencionado efectos negativos del glifosato sobre la bacteria *Vibrio fischeri* en cultivo (Bonnet *et al.* 2007, Tsui y Chu 2003), como así también sobre bacterias acuáticas en un estudio en mesocosmos (Chan y Leung 1986). Nuestros anteriores resultados explicados en el Capítulo 1 destacan que no se observaron diferencias significativas en la abundancia de bacterias heterotróficas entre los mesocosmos tratados y controles. Teniendo en cuenta las diferentes reacciones de las distintas especies bacterianas en respuesta al agregado de formulados de glifosato, sería muy importante profundizar los estudios realizando aproximaciones cualitativas en bacterias utilizando técnicas de DGGE o Card Fish, por ejemplo.

Se pueden apreciar claros cambios temporales de las comunidades planctónicas a lo largo del estudio en presencia del herbicida. El inmediato incremento de bacterias luego de aplicado el herbicida en las unidades experimentales, fue

rápidamente seguido por un aumento del nano- y microfitoplancton, probablemente favorecido por una mayor carga de nutrientes. *A posteriori*, y luego del decaimiento del fitoplancton de red, proliferaron las picocianobacterias, las que probablemente se vieron favorecidas por la presencia del herbicida a lo que se le sumó la ventaja competitiva de la disminución del fitoplancton mayor. A las dos semanas, las picocianobacterias pasaron a dominar la fracción autótrofa en la columna de agua de los microcosmos expuestos al Glifosato Atanor®. El incremento de picocianobacterias y también de algas perifíticas (ver más abajo), asociado a un aumento de la fotosíntesis trajo aparejado valores mayores de concentración de oxígeno disuelto y de pH del agua en presencia del herbicida.

En este experimento no observamos efecto negativo del herbicida en el fitoplancton de red y, si bien sólo a los 7 días la diferencia entre tratamientos fue significativa, la tendencia de que el herbicida favoreció su desarrollo es clara. A diferencia de lo observado en los mesocosmos (Capítulo 1), en estos dispositivos de menor tamaño y con Glifosato Atanor® esta fracción autotrófica proliferó. La disminución en la densidad del nano- y microfitoplancton notablemente visible a tiempo final, se registró en ambos tratamientos y podría deberse a distintas causas o una conjunción de ellas. Por un lado, una mayor presión de herbivoría por parte de los cladóceros del género *Moina*, los que proliferaron y se desarrollaron sin diferencias entre tratamientos. Por otro lado, hay que tener en cuenta la probable sedimentación de los organismos en las bolsas como así también el aumento significativo del perifiton que por competencia pudo afectar al fitoplancton de red.

En el zooplancton se pueden observar efectos indirectos y directos del herbicida. El gran aumento de densidad del rotífero *Lecane* spp. a tiempo final podría deberse al aprovechamiento por parte de estos organismos del alimento dado por las picocianobacterias y bacterias (Sarma *et al.* 2010) que aumentan en los microcosmos tratados con el formulado durante la experiencia. Este cambio en la composición del zooplancton es consecuencia de un efecto indirecto del herbicida que promovió el desarrollo de la fracción del plancton que sirve de alimento para *Lecane* spp. Esta situación seguramente podría provocar que, en sistemas naturales, el efecto en el zooplancton se desplace hacia niveles tróficos superiores que incluyan peces que consuman este tipo de rotíferos (Montenegro *et al.* 2006).

Un efecto directo del herbicida en el zooplancton pudo tener como blanco a una fracción de copépodos. En ambos tratamientos disminuyeron los calanoideos nauplii, probablemente debido a su desarrollo y posterior transformación en adultos en el lapso entre el inicio y el final de la experiencia. Pero, por un lado se observó una tendencia – aunque no significativa – a valores menores en densidad de calanoideos nauplii en

presencia del herbicida al tiempo final. Y por el otro lado, la densidad de calanoideos adultos fue significativamente menor en presencia del Glifosato Atanor[®] lo que estaría indicando que el herbicida afectó el desarrollo de las larvas registrándose menor densidad de adultos. Hemos descartado la posible disminución de adultos de copépodos calanoideos por competencia interespecífica con rotíferos de hábito alimenticio semejante. Los rotíferos del género *Lecane* spp. aparecen como muy abundantes y, al igual que los copépodos calanoideos, se alimentan de picoplancton y de bacterias (Sarma *et al.* 2010). Siendo que el alimento (bacterias y picocianobacterias) no era un factor limitante en los microcosmos con herbicida, el menor desarrollo de calanoideos nauplii en este tratamiento no parece deberse a competencia sino a un efecto toxicológico directo del herbicida. Existe profundo debate en el mundo sobre la forma de acción del glifosato en organismos no blanco y en animales, no se descarta su potencial efecto de disruptor endócrino (Gasnier *et al.* 2009, Paganelli *et al.* 2010, Richard *et al.* 2005, Walsh *et al.* 2000). Se ha reportado sensibilidad de los estadios nauplii del copépodo *Cyclops vernalis* a cuatro herbicidas (Robertson y Bunting 1976) lo que pone de manifiesto que es probable que el herbicida glifosato o alguno de sus formulados, como es el caso de Glifosato Atanor[®], provoque un efecto directo sobre estos estadios más sensibles. En este caso también se puede imaginar un escenario en donde el efecto se transmita a las tramas tróficas. Un decrecimiento en la densidad del zooplancton puede provocar muerte, enfermedad o menores tasas de crecimiento en peces (Perschbacher *et al.* 1997).

Chen *et al.* (2004) reportaron una menor supervivencia y desarrollo de juveniles de una especie de cladóceros en un bioensayo con el formulado de glifosato Vision[®], sin embargo, nosotros no observamos diferencias en este grupo de zoopláncteres en presencia del herbicida en microcosmos al aire libre. Por otro lado, la presencia de larvas de quironómidos a tiempo final en ambos tratamientos pudo ser producto de puestas de huevos por parte de los adultos durante la experiencia, proliferando las larvas sin dificultad en los microcosmos.

En relación a la comunidad perifítica se registraron nuevamente, como en los experimentos anteriores, mortandad de diatomeas y aumento de la abundancia de cianobacterias, sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en los estudios previos, se detectó un aumento de biomasa total perifítica con proliferación de algas filamentosas metafíticas. Ya que el formulado Glifosato Atanor[®] provocó en los microcosmos, como el Roundup[®] en mesocosmos, mortandad de diatomeas perifíticas, podemos decir que, tanto en reservorios de gran tamaño como en charcos temporarios y de poco volumen, las diatomeas son un grupo de algas que presentan gran susceptibilidad a formulados en base a glifosato. Este hecho concuerda con los

resultados reportados por Peterson *et al.* (1994) y por Tsui y Chu (2003), quienes determinaron mayor sensibilidad al glifosato de las diatomeas con respecto a las algas verdes.

Cabe pensar que esta mortandad de las algas perifíticas debería reflejarse en una disminución de la biomasa de la comunidad en los microcosmos tratados, sin embargo se observa un aumento en todas las variables de masa perifítica (PS, C, PSLC y P-Chl *a*). El incremento de las variables de masa, principalmente el PS, C y PSLC, pudo deberse a la mayor proliferación en la comunidad de bacterias, detritus orgánicos y organismos heterótrofos en general, típicos componentes que se desarrollan en fenómenos de contaminación orgánica (Harvey *et al.* 1984, Mudge y Seguel 1999). El aumento de la fracción autótrofa estimada a partir de P-Chl *a*, se podría deber a la presencia de algas filamentosas metafíticas las cuales aportan una gran biomasa algal sin incrementar de manera sustancial la densidad. Goldsborough *et al.* (2005) reportan concentraciones de clorofila para el metafiton que pueden llegar a valores de hasta 400 veces mayores que para el epifiton. Siendo las algas verdes las que portan en sus células clorofila *b*, el aumento de biomasa debido a las algas verdes filamentosas se puede comprobar por el aumento de clorofila *b* perifítica en los microcosmos con Glifosato Atanor[®]. El incremento en la biomasa perifítica observada en nuestro experimento es consistente con un estudio previo conducido en mesocosmos utilizando Roundup[®] a una concentración de ingrediente activo similar (3,8 mg/l) (Relyea 2005a), sin embargo, se atribuye este hecho a una disminución en los herbívoros provocada por el herbicida.

El aumento en las variables de masa perifítica en presencia del herbicida es opuesto a lo observado en los mesocosmos, experimento descrito en el Capítulo 3. Son muy marcadas las diferencias entre los ensayos ya que se utilizaron distintos formulados y concentraciones del principio activo. Además, se emplearon mesocosmos 300 veces más grandes a los microcosmos del presente estudio. Por lo que sugerimos que la diferente respuesta observada en la comunidad perifítica puede deberse a distintas causas o una asociación de ellas: a un efecto morfométrico como es la reducción del tamaño del reservorio, y/o a las diferencias con el formulado utilizado, Glifosato Atanor[®], que posee otros tensioactivos distintos al que posee el Roundup[®], y/o al efecto de las distintas concentraciones utilizadas.

Aunque durante el tiempo que duró la experiencia la estructura algal del perifiton al que se le adicionó glifosato no alcanzó a estar dominada por metafiton, se registró un marcado incremento temporal de estas algas verdes filamentosas. Esto podría indicar que el sistema tiende hacia el "Sheltered State" (estado de aguas protegidas), dominado por algas filamentosas del tipo Oedogoniales y/o Zygnematales

que conforman el metafiton, descrito por Goldsborough y Robinson (1996). A partir de experimentos controlados surge la evidencia de que una alta concentración de nutrientes es un prerrequisito necesario para el desarrollo de metafiton (D'Aiuto *et al.* 2006, Dodds y Gudder 1992, Gabor *et al.* 1994, McDougal y Goldsborough 1995, Murkin *et al.* 1994), que en nuestro experimento está dado por la adición del formulado de glifosato. Otras características de los cuerpos de agua que favorecen el estado de aguas protegidas y que se cumplen en nuestro estudio en microcosmos son, una columna de agua estable dada aquí por el refugio aportado por las bolsas, la ausencia de disturbios físicos, una alta irradiancia (Fong y Zedler 1993) ya que el experimento se llevó a cabo en el verano, un pH alto (Whitton 1970) y una alta conductividad (Dodds 1991).

La presencia de contaminantes puede producir daños en las membranas de los tilacoides y en el anclaje de las moléculas de clorofila en el centro de reacción, lo que trae aparejado una menor relación Chl *a/b* (Öncel *et al.* 2000, Pätsikkä *et al.* 1998, Samuel y Bose 1987). Se ha reportado una disminución del cociente Chl *a/b* en el alga *Chlorella kessleri* en cultivo, sometida a altas concentraciones de Glifosato Atanor[®] adicionado junto a un surfactante (Romero *et al.* 2011). En contraposición, nuestros resultados señalan un aumento en esta relación en los microcosmos tratados, que podría estar indicando un estímulo en la actividad de los fotosistemas de la fracción algal de la comunidad debido a la exposición al herbicida. Por otro lado, el aumento en esta relación puede deberse también a una variación en la composición taxonómica de la comunidad. El aumento relativo en la densidad de cianobacterias y diatomeas, que no poseen clorofila *b*, en relación a las algas verdes que sí poseen, podría trasladarse a incrementos en los valores de Chl *a/b*. Si bien registramos en este trabajo el aumento relativo de las cianobacterias y de las diatomeas en relación al total del grupos algales, el incremento en las algas verdes filamentosas, fue muy importante, situación que permitiría descartar el efecto de cambio en composición taxonómica de la comunidad. Otra explicación posible para el aumento registrado en el cociente Chl *a/b* pueden ser las bajas concentraciones de nitritos, nitratos y amonio hacia el final de nuestro estudio. Kitajima y Hogan (2003) han reportado el aumento del cociente Chl *a/b* en condiciones limitantes de nitrógeno en experimentos con plantas, afirmando la teoría de Hikosaka y Terashima (1995) que establece que la relación Chl *a/b* debería incrementarse con el decrecimiento del nitrógeno disponible.

Los cambios en los niveles de los parámetros de estrés oxidativo pueden reflejar disturbios ambientales (Bonnineau *et al.* 2010, 2011). A pesar de registrarse un aumento en la biomasa perifítica en los microcosmos con glifosato, el daño a lípidos, indicado por el aumento de la concentración de MDA, sugiere que el herbicida estaría

induciendo estrés oxidativo en la comunidad. El aporte dado por el estudio de procesos fisiológicos de la comunidad fue muy importante, ya que nos permitió vislumbrar que a pesar del aumento en su biomasa, la comunidad está siendo estresada por la presencia del xenobiótico en el ambiente. Cabe mencionar que estos resultados reflejan lo que le sucedió a la comunidad perifítica completa, es decir, todos los componentes autótrofos y los heterótrofos, incluidos las bacterias, protistas y animales en general. En el caso de las algas, la utilización de parámetros de estrés oxidativo para la evaluación de la toxicidad puede complementar la información obtenida según los criterios de evaluación clásicos, como la mortalidad, y pueden ser exitosamente utilizados evaluando el daño oxidativo por herbicidas (Geoffroy *et al.* 2004, Liu y Xiong 2009, Qian *et al.* 2008, 2009, Ross *et al.* 2006). Sin embargo, estos estudios han sido realizados en cultivos monoespecíficos de algas y según nuestro conocimiento, sólo tres estudios previos analizan parámetros de EO frente a contaminantes en comunidades, en especial, el perifiton (Bonnineau *et al.* 2010, 2011, Guasch *et al.* 2010), pero ninguno de ellos estudia la acción del glifosato. Sólo se ha encontrado un trabajo que estudia la exposición al Glifosato Atanor[®] junto a un surfactante pero sobre un alga en cultivo (Romero *et al.* 2011). Estos autores reportaron también un aumento en los niveles de MDA de *Chlorella kessleri* con la adición de este herbicida.

Para evaluar el estado fisiológico y la viabilidad celular del perifiton se utilizó un ensayo colorimétrico que no detecta células muertas sino sólo aquéllas que presentan actividad, y ha sido ampliamente utilizado para medir citotoxicidad, proliferación o activación celular (Mossman 1983). La comunidad control presentó una disminución de la actividad metabólica en los dos últimos muestreos, que se correlacionó con el aumento de la mortandad y la disminución de algas vivas perifíticas que se observó al microscopio y con la baja concentración de clorofila *a* perifítica determinada en esas fechas. Este comportamiento concuerda con el crecimiento característico de organismos bajo condiciones de recursos limitantes, en parte representados en este estudio por el limitado volumen de cada microcosmos y el área limitada de los sustratos. Hecho que se vería enmascarado en los microcosmos tratados debido al incremento de densidad algal provocada por la adición de nutrientes dada por el herbicida. En los microcosmos tratados, la comunidad perifítica presentó un aumento de la actividad metabólica al final de la experiencia, probablemente relacionado al aumento de la densidad de las algas verdes, las diatomeas y las cianobacterias vivas y otros organismos componentes de la comunidad.

La larga vida media del glifosato que fue determinada en este experimento (16 días) presentó un valor que se encuentra fuera del rango temporal reportado en la

bibliografía, con un máximo de dos semanas. En la discusión del Capítulo 1 se detallaron las características de los cuerpos de agua asociadas a la adsorción del glifosato. La disipación más lenta en nuestro estudio puede estar relacionada a las características del agua de los microcosmos que presentan altos pH. Goldsborough y Brown (1993) reportan una disipación más lenta del glifosato (vida media de 11,2 días) en estanques de aguas alcalinas que en aquéllos más diluidos, sugiriendo que la complejación del herbicida con los iones en solución puede ser un factor significativo que afecta la tasa de disipación en aguas lénticas.

Para completar nuestro análisis y poder discriminar si las diferentes respuestas de la comunidad perifítica de este estudio con respecto a los anteriores, se deben a un efecto morfométrico o al formulado de glifosato utilizado, deberíamos estudiar el efecto del Roundup® en microcosmos de volumen similar a los del experimento presentado en este capítulo. También quedaría por estudiar los efectos del herbicida a distintas concentraciones del ingrediente activo para poder discriminar si se trata de una consecuencia de las diferentes concentraciones utilizadas.

Hemos detectado en nuestro estudio importantes efectos, tanto directos como indirectos, del Glifosato Atanor® sobre las principales comunidades microbianas en cuerpos de agua dulce de tamaño reducido. A diferencia de lo ocurrido en los mesocosmos, una única aplicación del formulado de glifosato provocó la estimulación del crecimiento del bacterioplancton, de las cianobacterias del picoplancton y de la concentración de clorofila *a* del plancton. También, a diferencia de lo antes observado, el perifiton se vio estimulado en su desarrollo con un gran aporte de algas filamentosas, típicas de sistemas muy ricos en nutrientes, someros y de aguas mansas. Como consecuencia de lo anterior, hemos podido observar que el deterioro de la calidad del agua se acelera cuando se consideran sistemas acuáticos de pequeño volumen. Concluimos que aplicaciones de Glifosato Atanor® realizadas en forma intensiva y recurrente, provocarán rápidamente profundas modificaciones en los cuerpos de agua temporarios tan extensamente dispersos en nuestro país.

CAPÍTULO 5

EFECTO COMPARATIVO DEL GLIFOSATO GRADO TÉCNICO Y EL FORMULADO COMERCIAL GLIFOSATO ATANOR[®] SOBRE LA COMUNIDAD PERIFÉRICA DE AGUA DULCE

INTRODUCCIÓN

La contaminación de los sistemas acuáticos y los efectos sobre sus comunidades es un tema de gran preocupación y es fundamental encarar estudios para analizar los impactos a ese nivel de organización. Sin embargo, los ensayos de toxicidad están principalmente basados en estudios realizados sobre una única especie y no son fehacientemente extrapolables al nivel de la comunidad. La aplicación de ensayos rápidos y fáciles de manejar empleando niveles de estudio multiespecíficos es un desafío para la ecotoxicología de comunidades (Schmitt-Jansen y Altenburger 2008).

El efecto del glifosato o sus formulados sobre algas ha sido estudiado en mayor medida en cultivos de especies planctónicas en el laboratorio (Asselborn 2003, Christy *et al.* 1981, Gardner *et al.* 1997, Hess 1980, Lipok *et al.* 2010, Ma 2002, Ma *et al.* 2001, 2002, 2006, Richardson *et al.* 1979). Además existen bioensayos de toxicidad en algas sésiles (Blank *et al.* 1984, Maule y Wright 1984, Peterson *et al.* 1994) siendo, la mayoría, realizados sobre cultivos unialgales y pocos sobre comunidades perifíticas completas (Austin *et al.* 1991, Holtby y Baillie 1989, Kish 2006). Además, existe poca información disponible que compare los efectos del glifosato puro con alguno de sus formulados comerciales en especies perifíticas y fitoplanctónicas (Cedergreen y Streibig 2005, Powell *et al.* 1991, Sáenz y Di Marzio 2009, Sáenz *et al.* 1997, Tsui y Chu 2003) y ninguna comparando los efectos en comunidades.

Un parámetro estructural clásico para estudiar el perifiton es la medición de la concentración de clorofila *a*, como estimadora de la fracción autotrófica de la comunidad (biomasa algal). Debido a que la clorofila *a* es el pigmento más abundante y se encuentra en todas las algas y cianobacterias, los cambios en la relación de los pigmentos accesorios con respecto a la clorofila *a* pueden indicar cambios en las poblaciones dominantes del perifiton (Kish 2006, Ledger y Hildrew 1998). Por ejemplo, estas relaciones pueden ser utilizadas para comparar modificaciones en las proporciones relativas de los distintos grupos algales. En este sentido, el cociente Chl *b/a* permite analizar las variaciones en la proporción de clorofitas ya que este grupo tiene clorofila *b* como uno de sus pigmentos accesorios dominantes. Lo mismo sucede con las diatomeas, a través del cociente Chl *c/a* puesto que poseen clorofila *c* en tanto que las alteraciones en las proporciones relativas de las algas rojas, ricas en clorofila *d*, se pueden analizar a través del cociente Chl *d/a* (Stevenson 1996). Un ejemplo de este análisis se puede ver en el trabajo de Kish (2006), en donde se estudiaron los efectos del Roundup® sobre la estructura de la comunidad perifítica analizando los cambios en la composición de la clorofila total y las relaciones entre las clorofilas *b* y *c* y la Chl *a*.

En microalgas y plantas, los pigmentos fotosintéticos asociados a moléculas de proteínas se encuentran embebidos en las membranas de los tilacoides. Los organismos fotosintéticos poseen típicamente dos fotosistemas, el fotosistema I (FSI) y el fotosistema II (FSII), los cuales constan de un complejo central que contiene al *centro de reacción* (formado por clorofila *a*) rodeado por el *complejo antena* (formado por clorofila *a* y pigmentos accesorios). Las moléculas de pigmentos en el complejo antena absorben la energía luminosa de longitudes de onda distintas a las de la clorofila *a* y se la transfieren a los centros de reacción optimizando el recurso lumínico para la fotosíntesis. Entre los pigmentos que podemos encontrar en estos complejos antena están, las clorofilas y los carotenoides (carotenos y xantofilas) (Green *et al.* 1991, Salisbury y Ross 1994). Las Chlorophyta y plantas superiores poseen clorofila *b* como pigmento accesorio principal y para las algas de esta división, la cantidad de clorofila *a* es 6 veces mayor a la de clorofila *b* en el complejo antena del FSI. Por su parte, en el complejo antena del FSII la cantidad de clorofila *a* es 2 veces mayor a la de clorofila *b* (Reger y Krauss 1970).

El contenido de clorofilas y carotenos y la relación entre ellos puede considerarse también tanto un indicador de la integridad de los fotosistemas como un indicador de respuesta frente a un estrés. La relación Chl *a/b* es considerada como indicadora de la sensibilidad a factores externos (físicos o químicos) del complejo antena del FSII (Pintilie *et al.* 2006, Westerhoff *et al.* 1986), lo que nos permite utilizarla como una variable útil a la hora de analizar los efectos de contaminantes en organismos autotróficos. Los herbicidas, metales pesados y otros compuestos orgánicos pueden dañar las membranas de los tilacoides y/o la síntesis de proteínas que ensamblan las moléculas de clorofila en el FSII, perturbando los complejos estructurales pigmento-proteína localizados en la membrana de los tilacoides, provocando una disminución de la relación Chl *a/b* (Pätsikkä *et al.* 1998, Samuel y Bose 1987). Según Samuel y Bose (1987), el decrecimiento en esta relación puede ser debido a (i) un incremento en el tamaño de la unidad del FSII relativo al FSI, (ii) un incremento en el número de unidades del FSII, por lo tanto hay un aumento en el cociente FSII/FSI, o (iii) cambios en la proporción de Chl *a* y *b* mientras los otros componentes se mantienen inalterados.

Los carotenos en los organismos fotosintéticos están involucrados en la captura de luz, la transducción de energía, funcionan como pigmentos fotoprotectores contra la foto-oxidación y como reguladores de la eficiencia del FSII (Vorst *et al.* 1994, Yamamoto y Bassi 1996). Los carotenos también pueden actuar como compuestos antioxidantes removiendo las especies reactivas de oxígeno generadas por los metales pesados (Okamoto *et al.* 2001) o las altas intensidades de luz (Krinsky 1989).

Asimismo, la variación del contenido relativo de carotenos puede dar indicios de inducción de su síntesis como respuesta a factores de estrés como alta salinidad, temperaturas extremas, limitación de nutrientes y altas intensidades de luz (Ehling-Schulz *et al.* 1997, Ginzburg y Ginzburg 1985, Orset y Young 1999, Vorst *et al.* 1994) o de inhibición de su síntesis frente a ciertos herbicidas, los que pueden afectar distintos pasos de la carotenogénesis, ya sea, interfiriendo con distintas funciones enzimáticas, o inhibiendo la síntesis de enzimas esenciales para la biosíntesis de carotenoides (Ben-Aziz y Koren 1974, Burns *et al.* 1971, Harker y Young 1995, Samuel y Bose 1987).

El Glifosato Atanor[®] es uno de los formulados de glifosato más utilizados en nuestro país. Su composición química no figura en el marbete de sus envases comerciales ni se ha podido tener acceso a la misma a partir de consultas oficiales que hemos realizado a la empresa que lo fabrica, Atanor S.C.A., industria de químicos, petroquímicos, agroquímicos y polímeros que opera en Argentina. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en el experimento del capítulo anterior se comprobó que el Glifosato Atanor[®] tendría aditivos fosforados en su composición lo que nos motivó a realizar un nuevo experimento, como para profundizar el conocimiento sobre sus mecanismos de acción.

El **objetivo general** de la investigación de este capítulo es evaluar posibles efectos diferenciales entre el formulado Glifosato Atanor[®] y el de su principio activo, glifosato (en forma de sal de isopropilamina), sobre la fracción algal de la comunidad perifítica de agua dulce. Específicamente, se realizará un análisis temporal de las concentraciones de clorofilas *a* y *b* y de carotenos totales de perifiton desarrollado sobre sustratos artificiales en condiciones control (sin adición de herbicida), en presencia de glifosato puro y de Glifosato Atanor[®]. Se utilizarán microcosmos de 250 ml y se estudiará el efecto de los xenobióticos en las primeras horas luego de la aplicación.

Hipótesis

Considerando que el glifosato es el principio activo que afecta la ruta del ácido shikímico, se espera que:

H1: se registre una menor biomasa algal del perifiton, medida a través de la concentración de clorofila *a* en los microcosmos tratados con ambos herbicidas con respecto a los controles.

H2: no existan diferencias en la biomasa algal del perifiton en presencia de glifosato y en presencia de Glifosato Atanor[®].

H3: se modifique el contenido relativo de carotenos del perifiton en los microcosmos con adición de herbicidas con respecto a los controles.

Se considera que la relación clorofila *a/b* es indicadora de la sensibilidad a factores externos del complejo antena del FSII en los cloroplastos, por lo tanto, hipotetizamos que la adición de herbicida generará:

H4: una disminución en la relación Chl *a/b* del perifiton ante la adición de ambas presentaciones de herbicida con respecto a los controles.

MATERIALES Y METODOS

En la presente experiencia utilizamos perifiton desarrollado en sustratos artificiales que fueron puestos a colonizar en un ambiente artificial creado por nosotros. En este sentido, se utilizó un tanque de 3000 litros aprox. (Fig. 5.1) el que fue llenado con agua de red y al que se le agregaron plantas acuáticas de fondo no arraigadas (*Ceratophyllum* sp.). El tanque, ubicado al aire libre, se dejó evolucionar aproximadamente 6 meses con el objeto de obtener un cuerpo de agua en el estado de “aguas claras”, es decir, con vegetación macrofítica de fondo y alta transparencia del agua. El tanque se encuentra ubicado en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Los sustratos artificiales consistieron en tiras de policarbonato de 5 cm de largo por 2 cm de ancho y 1 mm de espesor dispuestas verticalmente en un perifitómetro. El 18 de enero de 2010, se colocó el perifitómetro (Fig. 5.1) suspendido dentro del tanque con el sistema en estado de “aguas claras” con la totalidad de sustratos a ser utilizados en la experiencia para ser colonizados.

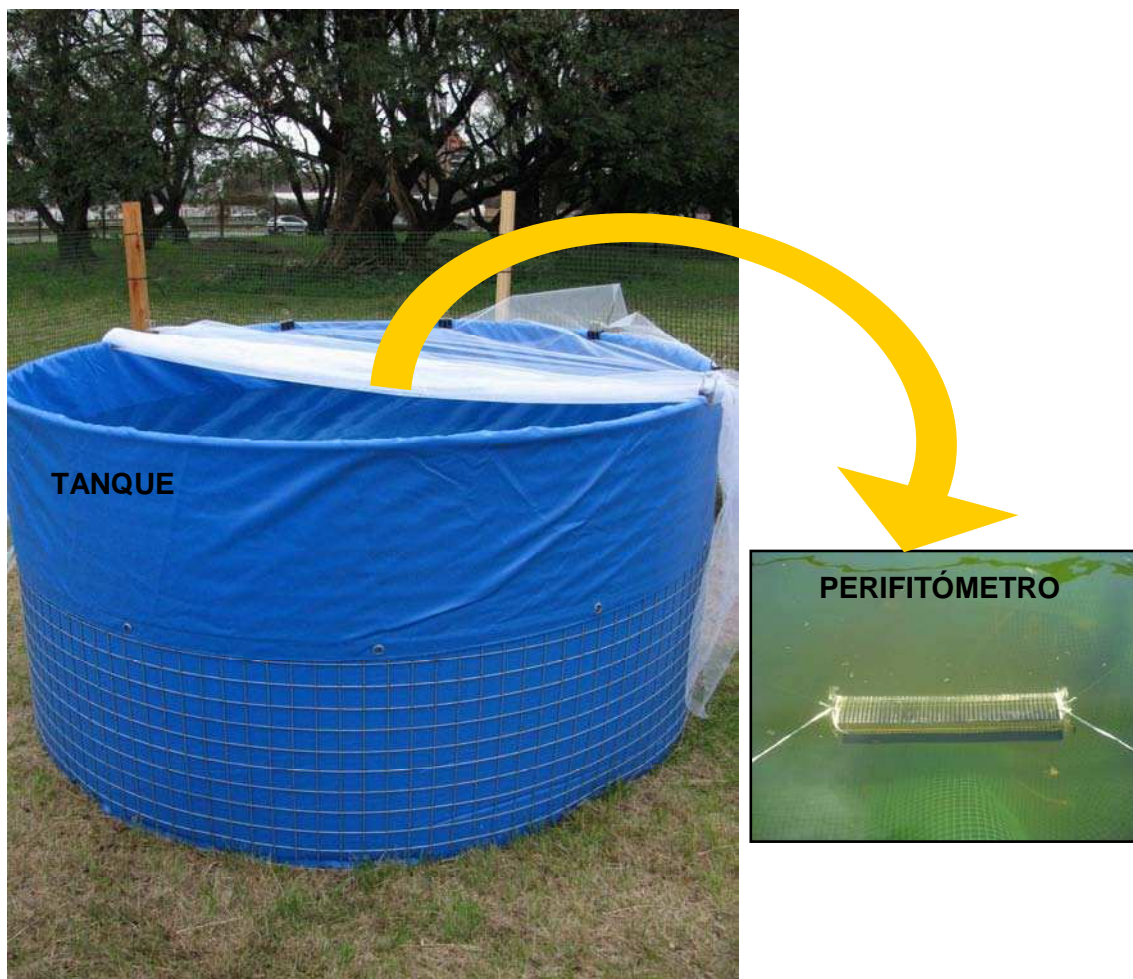


Fig. 5.1. Tanque donde se colocó el perifitómetro para colonizar los sustratos artificiales.

El perifitómetro se dejó incubando durante 21 días, tiempo en el que se alcanzó una biomasa perifítica que garantizaba una comunidad madura, comprobado mediante 3 mediciones sucesivas constantes de clorofila *a* perifítica. Con la comunidad desarrollada se realizó un bioensayo de laboratorio en el que se probaron tres tratamientos: dos herbicidas, *glifosato* (sal de isopropilamina) y *Glifosato Atanor*[®] (sal de glifosato al 48% p/v), ambos a una concentración de 3 mg de glifosato (i.a.)/litro y un *control* (sin adición de herbicida). Se utilizó la misma partida de Glifosato Atanor[®] que en el experimento anterior (Capítulo 4).

Para la preparación de las unidades experimentales se elaboró un medio de cultivo para lo cual se obtuvieron 7,5 litros de agua, del mismo tanque donde se había desarrollado la comunidad. El agua posteriormente se filtró por filtros GF/F Whatman[®] y se preservó congelada hasta el día de la preparación del medio.

Por otro lado, se prepararon soluciones stock de macro y micronutrientes (típicas del medio de cultivo BBM (Bold's Basal Medium)) de la siguiente manera:

- | | | |
|---|-------|-----------------------------|
| 1) NaNO ₃ | | 10g/400 ml agua bidestilada |
| 2) KH ₂ PO ₄ | | 7g/400 ml agua bidestilada |
| 3) K ₂ HPO ₄ | | 3g/400 ml agua bidestilada |
| 4) MgSO ₄ .7H ₂ O | | 3g/400 ml agua bidestilada |
| 5) CaCl ₂ .2H ₂ O | | 1g/400 ml agua bidestilada |
| 6) NaCl | | 1g/400 ml agua bidestilada |

I) Solución stock EDTA: diluyendo 50 g de EDTA (Ethylenediaminetetracetic acid) y 31 g de KOH, llevando a un volumen final de 1 litro en agua bidestilada.

II) Solución stock de Fe: diluyendo 4,98 g de FeSO₄.7H₂O llevando a un volumen final de 1 litro en agua bidestilada acidificada (preparada agregando 1 ml de H₂SO₄ concentrado a 999 ml de agua bidestilada).

III) Solución stock de Boro: diluir 11,42 g de H₃BO₃ llevando a 1 litro con agua bidestilada.

IV) Solución stock de Micronutrientes: diluir 8,82 g de ZnSO₄.7H₂O; 1,44 g de MnCl₂.4H₂O; 0,71 g MoO₃; 1,57 g CuSO₄.5H₂O y 0,49 g Co(NO₃)₂.6H₂O llevando a 1 litro con agua bidestilada acidificada (preparada como se describió arriba).

Además se elaboró una solución stock de silicato de sodio (Na₂SiO₃.9H₂O), agregando 2 g/100 ml de agua bidestilada.

El medio final en donde se ubicarían los sustratos colonizados se elaboró con el agua del tanque a la que se le agregaron las siguientes proporciones de las

soluciones stock: 10 ml/litro de medio de las soluciones 1) a 6), 1 ml/l de medio de las soluciones I) a IV) y 1 ml/l de medio de la solución de silicato de sodio.

El medio ya preparado se filtró por filtros de 0,45 μm de poro, y luego en condiciones estériles (en la cámara de flujo laminar) se procedió al filtrado por filtros de 0,22 μm de nitrocelulosa blanca lisa individuales y estériles (GAMAFIL). El medio de cultivo estéril se preservó en heladera en Erlenmeyers estériles hasta el comienzo del experimento.

Se prepararon las soluciones madre de glifosato y de Glifosato Atanor[®], con una concentración de 3 g i.a./litro cada una. Para obtener 10 ml de la solución madre de glifosato, se utilizaron 30 mg de glifosato (sal de isopropilamina) llevados a un volumen final de 10 ml con agua bidestilada. Además, se prepararon 5 ml de una solución madre de Glifosato Atanor[®], con 31 μl de la solución del formulado (48% p/v) que se llevó a un volumen final de 5 ml con agua bidestilada.

El día del comienzo del experimento se retiró el perifitómetro del mesocosmos y se lo trasladó en oscuridad y frío al laboratorio. En la cámara de flujo laminar, se agregaron 100 ml de medio de cultivo estéril a vasos de precipitados de 250 ml de capacidad previamente autoclavados. En total se prepararon 63 vasos necesarios para analizar 3 réplicas por tratamiento en cada tiempo de muestreo. Del total de vasos, a 21 seleccionados al azar se les adicionó 0,1 ml de la solución madre de glifosato puro y a otros 21, 0,1 ml de la solución madre de Glifosato Atanor[®] para obtener una concentración de 3 mg de glifosato/litro para ambos tratamientos. Luego cada vaso fue cubierto con film y llevado a la cámara de cultivo. Esta concentración de principio activo se eligió por ser similar y comparable con la utilizada en el experimento anterior (3,5 mg i.a./l, Capítulo 4).

Inmediatamente antes de comenzar la experiencia, se colocó un sustrato colonizado apoyado sobre una de sus caras en el fondo de cada uno de los 63 vasos de precipitados y se dispusieron al azar en la cámara de cultivo, a temperatura controlada (24 ± 1 °C) y con fotoperíodo (16 hs luz – 8 hs oscuridad). Las unidades experimentales quedaron entonces conformadas como el vaso de precipitados con un sustrato artificial colonizado con perifiton en un medio de cultivo sin limitación de nutrientes para la fracción autotrófica.

Se realizaron ocho muestreos a distintos intervalos de tiempo. El primero se efectuó momentos antes de la aplicación del herbicida. Los restantes fueron llevados a cabo a las 2, 6, 10, 24, 48, 96 y 192 horas luego de la aplicación del glifosato. En cada tiempo de muestreo se extrajeron al azar 3 réplicas de cada uno de los tratamientos para llevar a cabo el análisis de pigmentos de la comunidad perifítica.

La determinación de los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenos) se realizó como se describe a continuación. Los sustratos artificiales retirados de la cámara de cultivo se colocaron en cajas de Petri individuales en frío y oscuridad para su inmediato procesamiento. Todo el procedimiento se llevó a cabo en luz tenue, evitando la luz directa sobre los extractos para proteger a la clorofila de la fotooxidación. Se llevaron a cabo los siguientes pasos para cada uno de los sustratos artificiales:

- Obtención del perifiton por raspado de cada sustrato y lavado con el medio estéril preparado anteriormente.
- Introducción del material raspado y suspendido en medio en tubos Eppendorf debidamente rotulados.
- Centrifugado del raspado durante 10 minutos a 3.000 x g.
- Descarte del sobrenadante con pipeta automática.
- Traslado de las células de los distintos tubos a un único tubo Eppendorf, resuspendiendo el material con pipeta automática.
- Centrifugado del raspado durante 10 minutos a 3.000 x g para obtener el material final para la extracción.
- Agregado de 1,5 ml de acetona 80% (añadiendo primero 0,6 ml, sonicando 3 veces durante 15 segundos y luego adicionando los 0,9 ml restantes), agitado y homogeneización.
- Incubación por 1 hora en oscuridad a 4 - 10 °C (heladera).
- Centrifugado del tubo Eppendorf durante 10 minutos a 3.000 x g.
- Lectura de la absorbancia del sobrenadante a: 663,2 nm, 646,8 nm y 470 nm en espectrofotómetro UV/visible Simadzu.
- Determinación del contenido de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila total (Chl *a+b*) y carotenos totales de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/ml de extracto)} = (12,25 \times \text{Abs}^{663,2}) - (2,79 \times \text{Abs}^{646,8})$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g/ml de extracto)} = (21,5 \times \text{Abs}^{646,8}) - (5,1 \times \text{Abs}^{663,2})$$

$$\text{Clorofila } a+b \text{ (}\mu\text{g/ml de extracto)} = (7,15 \times \text{Abs}^{663,2}) + (18,71 \times \text{Abs}^{646,8})$$

$$\text{Carotenos totales (}\mu\text{g/ml de extracto)} = [(1000 \times \text{Abs}^{470}) - (1,82 \times \text{Chl } a) - (85,02 \times \text{Chl } b)] / 198$$

- Cálculo del contenido de pigmentos en la comunidad teniendo en cuenta la superficie de sustrato raspada.

La metodología descrita para la estimación de los pigmentos corresponde a Lichtenthaler (1987).

Análisis estadístico

Se examinaron los datos obtenidos con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov (con corrección de Lilliefors) y de la mediana de Levene, para corroborar normalidad y homocedacia, respectivamente. Para todas las variables, se realizaron análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA MR), con tres tratamientos (control, glifosato y Glifosato Atanor[®]) y ocho fechas de muestreo (0, 2, 6, 10, 24, 48, 96 y 192 horas). Se llevaron a cabo análisis de efectos simples cuando la interacción tiempo-tratamiento resultó significativa. Se realizaron comparaciones múltiples *a posteriori* usando el método de Tukey (Zar 1996).

RESULTADOS

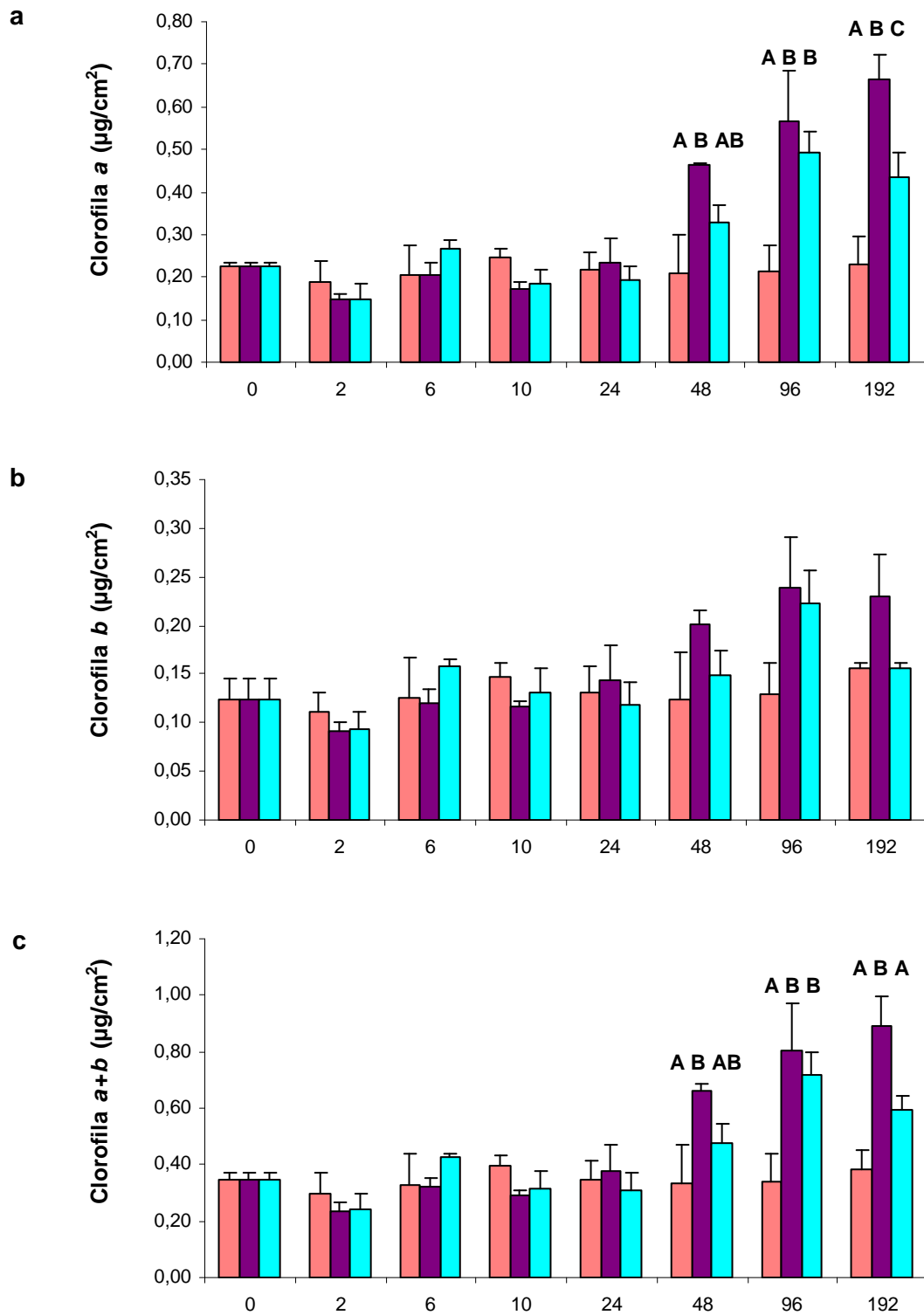
Los valores promedio de clorofila *a* perifítica estuvieron entre 0,19 y 0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, entre 0,15 y 0,66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y entre 0,15 y 0,49 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, en los tratamientos control, tratados con glifosato y con Glifosato Atanor[®], respectivamente. Se observaron diferencias significativas en la interacción tratamiento-tiempo para esta variable (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 5.1). Las comparaciones de medias revelaron diferencias significativas entre los tratamientos a partir de las 48 hs y hasta el final del experimento, con un incremento mayor en el perifiton tratado con glifosato puro a las 192 hs (Fig. 5.2a), y entre los tiempos a partir de las 48 hs de la experiencia para ambos tratamientos con herbicidas. A los 8 días (192 hs) de iniciado el ensayo, se registró un aumento de alrededor de 3 veces en la Chl *a* promedio para el tratamiento con glifosato con respecto al control y de aproximadamente el doble para el tratamiento con Glifosato Atanor[®] (Fig. 5.2a). El contenido de Chl *a* en el control no varió en todo el tiempo que duró la experiencia.

VARIABLE	EFECTO		
	Tratamiento	Tiempo	Trat. x Tiempo
Chl <i>a</i>	0,046	0,001	0,016
Chl <i>b</i>	0,208	0,035	0,240
Chl <i>a+b</i>	0,081	0,003	0,042
Chl <i>a/b</i>	0,190	0,010	0,030
Carot	0,177	0,003	0,017
Carot/Chl <i>a</i>	0,595	0,060	0,535

Tabla 5.1. Niveles de significancia de los ANOVA MR para los efectos del tratamiento, el tiempo y la interacción tratamiento-tiempo en los microcosmos control y tratados con glifosato y Glifosato Atanor[®] en los 8 tiempos para las concentraciones de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) y clorofila total (Chl *a+b*) y la relación clorofila *a/ b* (Chl *a/b*) y para el contenido de carotenos totales (Carot) y el cociente carotenos totales/clorofila *a* (Carot/Chl *a*) del perifiton. Valores de $p < 0,05$ están indicados en rojo.

El valor promedio de concentración de clorofila *b* perifítica fue de $0,15 \pm 0,05$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, con un rango de 0,08 a 0,29 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. No se detectaron diferencias significativas en la interacción tratamiento-tiempo, ni entre los tratamientos (ANOVA MR, $p > 0,05$, Tabla 5.1), pero sí se encontraron diferencias significativas entre los

tiempos (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 5.1) para la concentración de clorofila *b* perifítica (Fig. 5.2b), con diferencias significativas entre las 2 hs y las 96 hs de exposición.



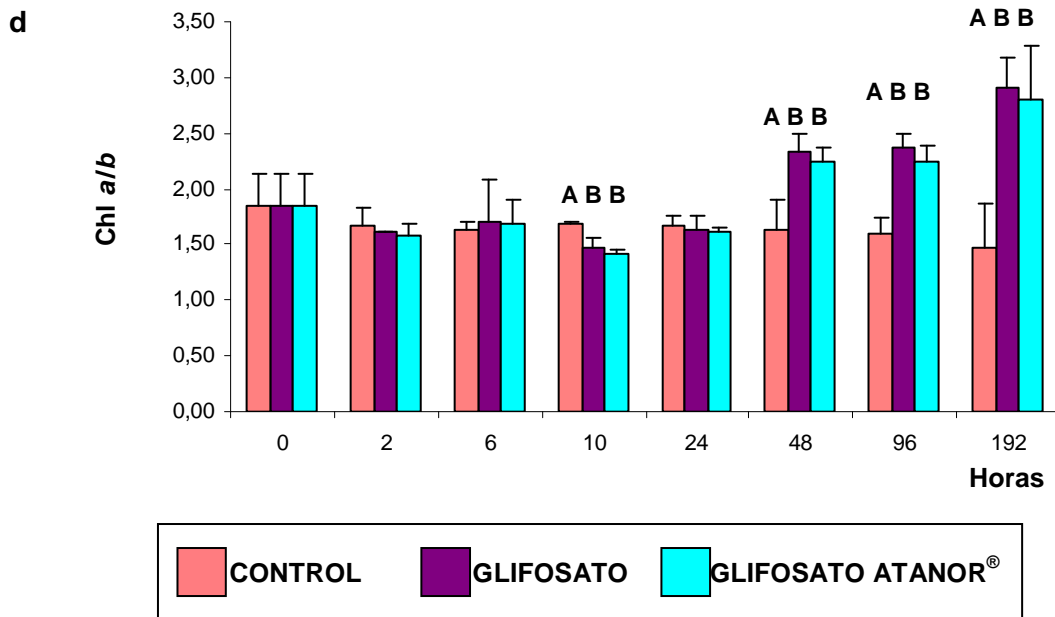


Fig. 5.2. Concentraciones promedio de **(a)** clorofila *a*, **(b)** clorofila *b*, **(c)** clorofila total (Chl *a+b*) y **(d)** valores promedio de la relación clorofila *a/b* (Chl *a/b*) de la comunidad perifítica a lo largo del experimento en los distintos tratamientos. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) están indicadas con distintas letras.

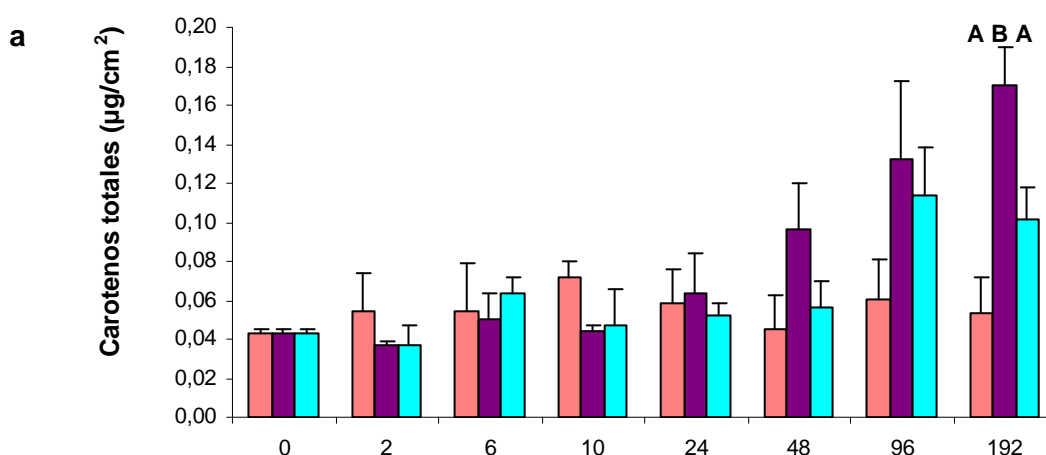
Los rangos medios de clorofila total (clorofila *a+b*) fueron de 0,30 a 0,40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, de 0,24 a 0,89 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y de 0,24 a 0,72 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, en los tratamientos control, tratados con glifosato y con Glifosato Atanor®, respectivamente. Se detectaron diferencias significativas en la interacción tratamiento-tiempo (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 5.1). Con diferencias significativas entre los tratamientos a partir de las 48 hs de exposición y hasta el final del experimento (Fig. 5.2c) y entre los tiempos a partir de las 48 hs para ambos tratamientos con herbicidas. Se registró, a los 4 días (96 hs) de iniciado el experimento, un aumento de alrededor del doble en la clorofila total en los tratamientos con herbicidas (Fig. 5.2c). La concentración de clorofila total en el control no varió en el tiempo que duró el ensayo.

Los valores promedio de la relación clorofila *a/b* estuvieron entre 1,48 y 1,85, entre 1,47 y 2,91, y entre 1,42 y 2,80, en los tratamientos control, tratados con glifosato y con Atanor®, respectivamente. El ANOVA MR mostró diferencias significativas en la interacción tiempo-tratamiento ($p < 0,05$, Tabla 5.1). La comparación de medias detectó diferencias entre los tratamientos a las 10 hs y a partir de las 48 hs de la experiencia (Fig. 5.2d), y entre los tiempos para ambos tratamientos con glifosato a partir de las 48 hs de exposición. A los 2 días de comenzado el experimento, se

observó un aumento del 40% aproximadamente en la relación Chl *a/b* promedio en los tratamientos con ambos herbicidas con respecto al control, este incremento alcanzó un valor del 100% en la última fecha de muestreo (8 días, Fig. 5.2d). La relación Chl *a/b* no varió durante el tiempo que duró el ensayo en el tratamiento control.

Los carotenos totales promediaron entre 0,04 y 0,07 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, entre 0,04 y 0,17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y entre 0,04 y 0,11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, en los tratamientos control, tratados con glifosato y con Glifosato Atanor[®], respectivamente. Se observaron diferencias significativas en la interacción tratamiento-tiempo para esta variable perifítica (ANOVA MR, $p < 0,05$, Tabla 5.1), y las comparaciones de medias revelaron diferencias significativas entre los tratamientos en el último tiempo de muestreo (192 hs) entre el control y el tratamiento con glifosato y entre los tratamientos con Glifosato Atanor[®] y con glifosato (Fig. 5.3a), y diferencias significativas entre los tiempos, a partir de las 96 hs para ambos tratamientos con herbicidas. En la última fecha de muestreo, el incremento registrado en los carotenos totales para el tratamiento con glifosato fue ~3 veces con respecto al control (Fig. 5.3a). El contenido de carotenos totales en el tratamiento control no varió durante el tiempo que duró el estudio.

Como una manera de medir si hubo aumento o disminución de la síntesis de carotenos en los organismos se analizó el cociente carotenos totales/clorofila *a*. El valor promedio de esta relación fue de $0,25 \pm 0,04$, con un rango de 0,16 a 0,32. (Fig. 5.3b). El ANOVA de medidas repetidas no mostró diferencias significativas entre tratamientos, entre tiempos o en la interacción tratamiento-tiempo para la variable carotenos/clorofila *a* ($p < 0,05$, Tabla 5.1) lo que implica que no hubo mayor síntesis de carotenos en presencia de los herbicidas. La relación carotenos/Chl *a* no varió en el tiempo en los tratamientos control.



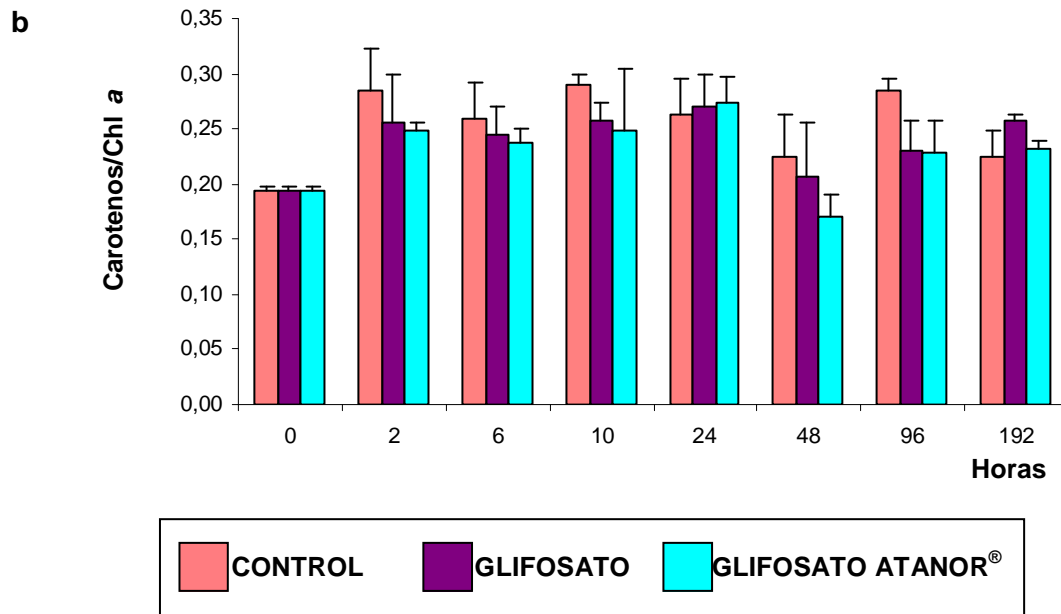


Fig. 5.3. (a) Concentración promedio de carotenos totales, y **(b)** valores promedio de la relación carotenos totales/clorofila a de la comunidad perifítica a lo largo de la experiencia en los distintos tratamientos. Las barras de error representan +1 desvío estándar. Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) están indicadas con distintas letras.

DISCUSIÓN

A diferencia de lo esperado, luego de 2 días de la adición de ambos herbicidas se observó un aumento significativo tanto de las clorofilas como de los carotenos totales del perifiton. Habiendo partido de una comunidad perifítica madura y embebida en un medio de cultivo con nutrientes en exceso y sin limitación de luz, tanto el formulado Glifosato Atanor[®] como su principio activo puro, lejos de disminuir el desarrollo de la fracción autotrófica de la comunidad, la estimularon. Ni el glifosato puro ni uno de sus formulados disminuyeron la fracción algal perifítica, tal como se esperaba considerando que estos autótrofos estarían afectados por el glifosato por presentar la ruta del ácido shikímico para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Estos resultados son semejantes a los explicados en el Capítulo 4 en donde se utilizaron microcosmos al aire libre, pero contrarios a los obtenidos en mesocosmos al aire libre, analizados en el Capítulo 3.

En este experimento, el aumento en la clorofila *a* en el tratamiento con Glifosato Atanor[®] fue de 2 veces con respecto tanto al control como al tiempo inicial. Por su parte, en el ensayo realizado en microcosmos al aire libre, utilizando una concentración del principio activo similar, el aumento de la clorofila *a* fue de más de 3 veces (página 108, Capítulo 4). La diferencia en crecimiento puede deberse a que en los microcosmos al aire libre se desarrollaron algas filamentosas metafíticas que aportan gran biomasa algal, y que no se observaron en los microcosmos de laboratorio. Al igual que en el presente experimento, Holtby y Baillie (1989) también reportan un aumento en la concentración de clorofila *a* de la comunidad perifítica en sitios naturales luego de la aplicación de Roundup[®]. Por otro lado, en el experimento que realizamos en mesocosmos al aire libre (Capítulo 3), registramos disminución en la concentración del pigmento, habiendo utilizado Roundup[®].

Se observa que no se ha obtenido una única respuesta de la variable concentración de clorofila *a* del perifiton en esta tesis, quedando nuevamente en evidencia que son muchos los factores que interactúan en la respuesta que da el perifiton ante la exposición a este herbicida. Por ejemplo, la utilización de distintos formulados con diferentes composiciones; diferentes concentraciones del principio activo; variaciones dadas por la distinta morfometría de los cuerpos de agua; posibles impactos indirectos ante modificaciones en presiones de competencia, herbivoría, etc. Se abre un sinnúmero de preguntas que están aún pendientes de responderse para poder describir más precisamente el impacto de estos herbicidas en la naturaleza.

En contraposición a lo esperado, no se registraron alteraciones en la relación carotenos/Chl *a*, por lo que no parece estar implicada una inhibición de la síntesis de carotenos como fuera sugerido por Romero *et al.* (2011) para *Chlorella kessleri*

expuesta a altas concentraciones de Glifosato Atanor[®] adicionado junto a un surfactante. En ese trabajo, se observa la disminución de la síntesis de este pigmento accesorio bajo una concentración de 70 mg/l de glifosato, valor muy lejano al utilizado por nosotros en este ensayo y que representa un escenario natural muy dramático. Podemos suponer que, al igual que con otras variables mencionadas, para los carotenos/Chl *a* también pueden existir respuestas diferenciales según las concentraciones del principio activo a las que se exponen las poblaciones algales.

El aumento en la concentración de clorofila total (Chl *a+b*) en los tratamientos con herbicida con respecto a los controles a partir de los 2 días de exposición, concuerda con los resultados reportados por Kish (2006). Este autor observó, luego de 7 días de exposición, un aumento en el contenido de clorofila total de la comunidad perifítica a la concentración más baja (7,8 mg i.a./litro) de Roundup[®] ensayada y una disminución de la clorofila total con el aumento de la concentración de herbicida, aparente dualidad atribuida a la hormesis. El término *hormesis* fue introducido por primera vez en el año 1943 (Southam y Ehrlich 1943 en Calabrese 2005). La hormesis (del griego *hormaein* -estimular-) es un fenómeno fisiológico de dosis-respuesta caracterizado por una inhibición de la respuesta a dosis altas y una estimulación a dosis bajas, siendo generalmente el incremento entre un 30% y un 60% por sobre los valores control (Calabrese y Baldwin 2002). Según nuestros resultados, el aumento registrado tanto en la clorofila total como en la relación Chl *a/b* fue de un 100% con respecto al control, valor tolerable para considerar que podríamos estar ante un fenómeno de hormesis. Por lo tanto, no deberíamos descartar la posibilidad de que este efecto esté ocurriendo y que de esta manera se expliquen estos incrementos en los pigmentos de la fracción algal completa de la comunidad perifítica. Existen trabajos previos que reportan que el ingrediente activo glifosato y el formulado Roundup Bio[®] provocan hormesis en distintas especies de algas verdes en cultivo (Cedergreen *et al.* 2007, Sáenz y Di Marzio 2009). Forlani *et al.* (2008) demostraron que las cianobacterias poseen una gran tolerancia natural al herbicida glifosato en bioensayos de laboratorio. Estos autores registraron, para las especies *Arthrospira fusiformis* y *Spirulina platensis*, tolerancia a concentraciones tan altas como 1690,7 mg/l de glifosato. Además, detectaron un aumento del crecimiento de *Nostoc punctiforme* a 5 mg/l de glifosato y una posterior reducción de su crecimiento a concentraciones mayores, lo que podría indicar que este herbicida puede provocar hormesis en esta especie de cianobacteria. Sáenz y Di Marzio (2009) explican que el fenómeno de hormesis por ellos registrado para cuatro especies de algas verdes sería una respuesta adaptativa de los organismos frente a una disrupción de la homeostasis debido a un estrés ambiental inducido, y que ocurriría una sobrecompensación como

resultado de un proceso de traslado de recursos levemente en exceso para recuperar la homeostasis. De acuerdo a estos antecedentes y a nuestros resultados sería interesante entonces realizar nuevos estudios con concentraciones sucesivas del principio activo para poder detectar si se cumple el fenómeno de hormesis en el caso del Glifosato Atanor[®] y el glifosato puro sobre toda la comunidad perifítica.

Las alteraciones del FSII en Chlorophyta y plantas superiores pueden ponerse de manifiesto mediante un aumento o una disminución en la relación clorofila *a/b* (Melis 1991, Pintilie *et al.* 2006, Samuel y Bose 1987). Los procesos fisiológicos de senescencia y la exposición a contaminantes pueden conducir a daños en las membranas de los tilacoides y en el anclaje de las moléculas de clorofila en el centro de reacción, lo que se refleja en una menor relación Chl *a/b* (Öncel *et al.* 2000, Pätsikkä *et al.* 1998, Samuel y Bose 1987). Romero *et al.* (2011) han reportado una disminución de esta relación en *Chlorella kessleri* sometida a 70 mg/l de Glifosato Atanor[®]. En cambio, en este estudio se registró un incremento de la relación Chl *a/b* a partir de los 2 días y hasta el final del experimento en ambas presentaciones de glifosato, resultado semejante al obtenido a los 21 días de exposición al Glifosato Atanor[®] en microcosmos al aire libre (Capítulo 4). Estos aumentos en el cociente Chl *a/b* podrían estar indicando un estímulo en la actividad de ambos fotosistemas de la fracción algal de la comunidad debido a la exposición a los herbicidas. Este hecho se condice con el aumento de la biomasa autótrofa en el perifiton expuesto, estimada a través de la concentración de clorofila *a* medida. Otra posible explicación al incremento en el cociente Chl *a/b* podría estar relacionada con la hipótesis de Hikosaka y Terashima (1995) según la cual esta relación debería incrementarse con una disminución de la disponibilidad de nitrógeno; sin embargo ésta no sería plausible debido a que la comunidad no se hallaba limitada por este nutriente ya que se encontraba inmersa en un medio sin deficiencias nutritivas. Por otro lado, debemos tener en cuenta que el aumento en Chl *a/b* también puede ser el resultado de una variación en la composición taxonómica de la comunidad. Un cambio en las proporciones relativas de los grupos algales con una mayor proporción de cianobacterias y/o diatomeas, que no poseen clorofila *b*, en relación a las clorofitas que sí poseen (Kirk 1994), podría traducirse en mayores valores del cociente Chl *a/b*. Si bien no se analizó la composición taxonómica del perifiton en este experimento, en esta tesis hemos podido demostrar que en mesocosmos y en microcosmos al aire libre, adicionados con Roundup[®] o con Glifosato Atanor[®], la proporción de cianobacterias perifíticas siempre se incrementó en relación a otros grupos algales, a diferencia de las diatomeas que resultaron sensibles a los herbicidas utilizados. Estos resultados nos permitirían sugerir que en el presente ensayo en microcosmos de

laboratorio pudo además suceder la misma situación, *i.e.* un cambio en la composición taxonómica hacia una comunidad con una mayor proporción de cianobacterias, de excelente desarrollo en situaciones de estrés (Powell *et al.* 1991).

Ha sido reportado en la literatura que la toxicidad de los formulados es mayor a la del glifosato puro para algunos organismos no blanco. Sáenz *et al.* (1997) determinaron que el surfactante incrementa la toxicidad del glifosato en algas verdes dulceacuícolas en bioensayos de laboratorio llevados a cabo con glifosato grado técnico y Rondo[®] (producto que incluye un surfactante desconocido). Cedergreen y Streibig (2005) y Sáenz y Di Marzio (2009) reportaron que el Roundup[®] resultó más tóxico que el glifosato puro para distintas especies de algas verdes en cultivo. Powell *et al.* (1991) registraron una mayor toxicidad del Roundup[®], seguido por el glifosato como sal y luego como ácido en dos especies de cianobacterias, aunque en todos los casos los organismos presentaron un alto grado de tolerancia. Por último, Tsui y Chu (2003) además compararon la toxicidad del surfactante POEA, que resultó más perjudicial que el formulado Roundup[®] y el glifosato como ácido y sal en dos especies de algas. Sin embargo, según nuestros resultados no existiría una mayor toxicidad sobre la fracción algal del perifiton por parte de los aditivos del formulado Glifosato Atanor[®], ya que el efecto que produce éste no difiere o es menor a la de su principio activo. Ambos herbicidas provocaron un incremento en la biomasa algal perifítica que se mantiene aún hasta los 8 días de exposición. Por otro lado, nuestros resultados señalan que existiría un efecto antagónico entre el glifosato y los surfactantes en el formulado Glifosato Atanor[®] ya que el perifiton expuesto al formulado presenta signos de recuperación (*e.g.* clorofilas *a* y *b*, clorofilas totales y carotenos totales) en relación al glifosato puro.

Estos resultados estarían además brindando mayor precisión a lo discutido en el Capítulo 4 en donde observamos una aceleración del deterioro de la calidad del agua con el aumento del fósforo total explicado por el aporte de la molécula del glifosato y de el/los aditivo/s que presenta la fórmula comercial. Las explicaciones sugeridas a este veloz deterioro eran tres. La primera tenía en cuenta el posible efecto de las distintas concentraciones de principio activo utilizadas. La segunda, consistía en el efecto morfométrico, ya que comparábamos microcosmos de 90 litros con mesocosmos de más de 30.000 litros. La tercera explicación involucraba las diferencias en los formulados utilizados, con una mayor cantidad de fósforo aportada por el Glifosato Atanor[®] que estimularía el desarrollo algal en comparación con el Roundup[®]. En el presente experimento se observa que el aumento en la clorofila *a* con el formulado Glifosato Atanor[®] es significativamente menor o similar a la del glifosato puro, lo que nos permitiría descartar el efecto provocado por el tipo de formulado

utilizado, quedando para analizar los posibles impactos diferenciales dados por la morfometría y/o las distintas concentraciones del principio activo.

Este experimento nuevamente pone en evidencia el impacto que tiene el herbicida glifosato y uno de sus más utilizados formulados sobre una comunidad de agua dulce no blanco. Aportamos nuevos resultados que comprueban en este caso, en la concentración ensayada, que estos herbicidas, lejos de disminuir la biomasa autotrófica, la estimulan, provocando el crecimiento de una comunidad microbiana que juega un rol relevante en la ecología general de los cuerpos de agua.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

En esta tesis se evaluaron los efectos en la comunidad perifítica de agua dulce provocados por los formulados de glifosato Roundup® y Glifosato Atanor® así como también del glifosato puro. La mayoría de los estudios se llevaron a cabo principalmente a nivel ecosistémico, ya que se estudió el impacto de algunos formulados en el perifiton y en otros componentes biológicos microbianos, como el fitoplancton, bacterioplancton y zooplancton, analizando las interacciones entre estas comunidades y con el medio abiótico en escenarios con y sin xenobiótico. También, se hizo un estudio a nivel comunidad, estudiándose comparativamente los efectos por separado del Glifosato Atanor® y de su principio activo, glifosato en forma de sal de isopropilamina. Todos los ensayos se trataron de análisis multiparamétricos, ya sea a escala mesocosmos, simulando cuerpos de agua someros y permanentes, o a escala de microcosmos, aparentando charcos temporarios como los que pueden formarse luego de una lluvia dentro de los campos de cultivo.

Un resultado emanado de los experimentos mencionados fue la respuesta diferencial del perifiton obtenida en los tratamientos control con respecto a los tratamientos con glifosato (o un formulado). Las respuestas de la comunidad perifítica a los tóxicos presentes en el ambiente acuático circundante en cada experimento se produjeron rápidamente, corroborando que esta comunidad es una excelente herramienta biomonitora para los estudios de la calidad del agua.

Se registraron efectos directos diferenciales del Roundup® sobre los componentes algales de la comunidad perifítica en el primer experimento en mesocosmos al aire libre (Capítulo 1). Si bien la fracción algal se redujo significativamente, el herbicida afectó más negativamente a las diatomeas perifíticas con una disminución de su proporción relativa en tanto que las cianobacterias mostraron un aumento en su proporción en la comunidad. De manera similar, en el fitoplancton se registró un extraordinario aumento de picocianobacterias, poniendo de manifiesto que estos organismos no sólo son tolerantes sino que se ven estimulados en su crecimiento. Una sola aplicación del formulado Roundup® provocó un aumento del fósforo total y alteraciones a corto y largo plazo en los mesocosmos. Por un lado, en corto tiempo el herbicida afectó la estructura y funcionamiento de las comunidades biológicas en los sistemas experimentales. Por el otro lado, el potencial de eutroficación a largo plazo dado por el aporte de glifosato a los cuerpos de agua analizado en el Capítulo 2, es un efecto importantísimo que puede ser generado por este herbicida y que va en detrimento de la calidad del agua de los sistemas acuáticos. Las consecuencias no sólo se restringen a lo ambiental, sino que también se le suman el impacto negativo generado por las condiciones indeseables para el uso del agua

con diversos fines, los riesgos para la salud humana así como los perjuicios socioeconómicos que generan sistemas de tan baja calidad ecológica como los cuerpos de agua eutróficos y con perspectivas a incrementar su deterioro.

Según los resultados del experimento en mesocosmos con distintas características limnológicas (Capítulo 3) se observa el retraso en la colonización sufrido por la comunidad perifítica en los mesocosmos tratados con el formulado. Nuevamente las diatomeas fueron el grupo algal de la comunidad perifítica más afectado por el Roundup® mientras que las cianobacterias comparativamente se vieron beneficiadas. Estos resultados muestran la limitación del perifiton de colonizar nuevos hábitats en escenarios afectados por el herbicida, lo que traería aparejado importantes consecuencias ecológicas. El perifiton, junto a las macrófitas sumergidas, conforman las principales comunidades autótrofas que compiten con el fitoplancton, limitando su crecimiento y contribuyendo a generar condiciones de lagunas claras de alta biodiversidad, según la hipótesis de equilibrios alternativos en lagos someros de Scheffer *et al.* (1993). En este experimento, también la adición del herbicida provocó el aumento del fósforo total, tanto en lagunas claras como turbias, sugiriendo que este efecto sea independiente del tipo limnológico del sistema.

En el caso del estudio en microcosmos al aire libre (Capítulo 4) nuevamente, las diatomeas conformaron el grupo de algas perifíticas más sensible, mientras que las picocianobacterias planctónicas y cianobacterias perifíticas pudieron tolerar el glifosato y se vieron beneficiadas por el herbicida, en ambos tipos de formulados comerciales empleados en la tesis. Sin embargo, y a diferencia de los resultados anteriores, en el tipo de dispositivo experimental utilizado, microcosmos de 90 litros, aumentaron tanto la densidad algal como la biomasa total perifítica con proliferación de algas filamentosas metafíticas. Estos organismos, lejos de verse afectados de manera directa por el herbicida a la concentración utilizada, encontraron condiciones que favorecieron su desarrollo: altas concentraciones de nutrientes y estabilidad de la columna de agua. Sin embargo, a pesar de este incremento, el perifiton presentó señales de estrés oxidativo por acción del herbicida. En este experimento también se comprobó el deterioro de la calidad del agua por adición de Glifosato Atanor®, pero éste tuvo lugar rápidamente, debido probablemente al volumen reducido de las unidades experimentales. Además, el aumento del fósforo total por adición del herbicida observado fue mayor al esperado por la contribución exclusiva de fósforo por parte de la molécula de glifosato. Nosotros sugerimos que el exceso en fósforo tuvo que provenir de los aditivos del formulado utilizado, seguramente ricos en fósforo. Las comunidades planctónicas también se vieron afectadas registrándose efectos positivos sobre las bacterias heterótrofas y el nano- y microfitoplancton. Por su parte, el

zooplancton evidenció efectos directos negativos del Glifosato Atanor[®] sobre los calanoideos nauplii y también indirectos sobre los rotíferos *Lecane* spp., que se vieron favorecidos por una mayor oferta alimentaria, bacterias y picocianobacterias planctónicas, producto de la acción del herbicida.

Queda en evidencia que son grandes los cambios en la estructura de las comunidades microbianas producidos por los diferentes herbicidas con glifosato, los que se traducen en una modificación general del componente biológico de un ecosistema ya que los efectos se pueden propagar a lo largo de las tramas tróficas, alterando los niveles tróficos superiores.

En los microcosmos de menor volumen utilizados en el laboratorio (Capítulo 5), tanto el glifosato puro como el Glifosato Atanor[®] provocaron la estimulación de la biomasa autotrófica perifítica, con aumentos en el contenido de clorofilas y carotenos totales de la comunidad. En este caso, el incremento de la relación clorofila *a/b*, podría estar indicando, como fuera observado en los estudios anteriores, un aumento de la proporción de cianobacterias perifíticas, o una estimulación de la actividad de los fotosistemas.

PERSPECTIVAS

Los aportes generados por estos estudios, tanto a nivel comunidad como ecosistema dejan en evidencia que la problemática relacionada al impacto que tiene el glifosato sobre el perifiton y las comunidades microbianas en general es compleja. Con estos resultados estamos lejos de describir completamente la situación sino que queda claro que se tiene que seguir profundizando el análisis en otros aspectos. Por ejemplo, ya que se tuvieron en cuenta los primeros niveles de las tramas tróficas, resultaría muy interesante poder incorporar niveles superiores como los peces, anfibios y aves acuáticas como para analizar efectos directos e indirectos por propagación entre los componentes tróficos. Distintos ensayos de toxicidad del glifosato sobre peces indican que éstos también se verían afectados directamente por la toxicidad del herbicida (Pérez *et al.* 2011) como por los efectos indirectos que genera en el ambiente acuático, como la degradación de la calidad del agua. Quirós *et al.* (2002b) señalan que la eutroficación de las lagunas pampeanas por efecto de los fertilizantes produce profundos cambios en la comunidad de peces. Las poblaciones de anfibios han sufrido importantes disminuciones debido a varios factores, entre ellos su sensibilidad a los herbicidas (Cauble y Wagner 2005, Smith 2001). Varios estudios han demostrado los efectos del glifosato y sus formulados sobre el desarrollo y crecimiento de larvas (Lajmanovich *et al.* 2003, Mann y Bidwell 1999, Smith 2001) y en la metamorfosis

(Cauble y Wagner 2005) de distintas especies de anfibios. Linz *et al.* (1996) reportaron que modificaciones en la densidad de la vegetación acuática emergente (*Typha* spp.) por acción de herbicidas a base de glifosato provocó la disminución de la densidad de tres especies de aves características de humedales dominados por esta especie de macrófita.

Si bien en esta tesis nos hemos focalizado mayoritariamente en la fracción autótrofa del perifiton, sería importante también incorporar en el análisis los otros componentes de la comunidad y principalmente en estudios de este tipo, la fracción bacteriana, aplicando técnicas de DGGE y Card Fish, entre otras.

Por otro lado, en esta tesis hemos demostrado que el perifiton presentó diferentes respuestas ante la adición de herbicidas. En el experimento realizado en mesocosmos (30.000 litros aprox.) se adicionó el formulado de glifosato Roundup® y se observó una disminución de la biomasa perifítica, en cambio al realizar las experiencias en microcosmos (90 litros y 250 ml) agregando Glifosato Atanor® o glifosato grado técnico a una concentración menor, menos de la mitad de la utilizada en los mesocosmos, se observaron significativos aumentos de las variables de masa de la comunidad perifítica al agregar el herbicida. Con el experimento en microcosmos de laboratorio pudimos descartar que fuera el tipo de formulado el factor que desencadenara la respuesta diferencial en el perifiton en el experimento del Capítulo 3 *versus* el del Capítulo 4. Hemos discutido oportunamente que la diferente morfometría de los sistemas puede ser un factor condicionante de la respuesta de la biomasa perifítica. En este sentido, proponemos nuevos estudios manipulando la variable morfometría de las unidades experimentales con estudios en micro- y mesocosmos de distinto volumen, tanto en laboratorio como al aire libre con el objetivo de analizar profundamente esta problemática.

Tal como lo señaláramos oportunamente, sería importante analizar el posible efecto de la concentración en el impacto del herbicida, probando por ejemplo las respuestas a concentraciones crecientes del ingrediente activo, tanto para los formulados como para el glifosato grado técnico y determinar si existe el fenómeno de hormesis, descrito en el Capítulo 5.

Sería interesante investigar qué cambios ocurren en las cianobacterias que se verían estimuladas ante la presencia de ambas presentaciones del herbicida en los microcosmos de laboratorio. Ya que en ese caso, la comunidad se encontraba embebida en un medio rico en nutrientes, a diferencia de lo sucedido en los microcosmos de mayor tamaño en los cuales pudo haberse presentado una limitación, y el incremento de cianobacterias sería atribuible a la adición de fósforo con el agregado de los formulados.

Es muy importante continuar con los estudios de toxicidad con formulaciones de glifosato y no solamente sobre el ingrediente activo en particular, ya que son los que efectivamente se vuelcan al ambiente, su composición es generalmente desconocida y pueden provocar otras respuestas en el medio (Lajmanovich *et al.* 2011). Ya mencionamos que los agregados pueden ser aun más perjudiciales que el principio activo (Tsui y Chu 2003).

También resultaría interesante analizar el poder de recuperación de las comunidades perifíticas al glifosato, como de todo el sistema en general. Existen escasos trabajos que estudian el poder de recuperación de las algas a los pesticidas (Gustavson *et al.* 2003, Sáenz *et al.* 2001), y menos aún al glifosato. Sáenz y Di Marzio (2009) han reportado la recuperación del crecimiento exponencial de cuatro algas clorofitas dulceacuícolas expuestas al glifosato, en forma de principio activo y el formulado Roundup[®], al cabo de 10 días de recuperación. Para realizar experimentos de recuperación del perifiton, se deberían utilizar comunidades provenientes de cuerpos de agua dulce naturales que preferentemente no hayan sido sometidos en gran medida a pesticidas, las que luego de un determinado tiempo de exposición al herbicida serán sometidas a un medio libre de glifosato.

En la naturaleza, los organismos se ven sometidos a una exposición repetida de los plaguicidas. La posibilidad de que una comunidad pueda verse afectada por una perturbación y luego recuperarse dependerá de su resistencia y su resiliencia. El impacto o cambio ante un agente externo será menor cuanto más resistente sea el sistema en tanto que su capacidad para restablecerse a su estado inicial dependerá de cuán resiliente sea. Mayor resiliencia tendrán las comunidades que vuelven a sus características iniciales ante una alteración (Begon *et al.* 1996). Un ecosistema acuático puede recibir cargas de formulado de glifosato frecuentemente, por lo que dependerá de las características de las comunidades el poder recuperarse. Por lo tanto, también será interesante realizar experimentos que simulen eventos reiterados de adición de formulados de glifosato en comunidades con diferentes resistencia y resiliencia ante las perturbaciones.

En Argentina el glifosato comienza a ser utilizado siendo clasificado por el SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, como de “menor riesgo toxicológico” (Clase IV) (www.senasa.gov.ar), utilizando criterios de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA-USA). La EPA-USA, por su parte, clasifica al glifosato como de “toxicidad leve” (www.epa.gov) a partir de estudios realizados por la empresa multinacional Monsanto, inventora del herbicida. Monsanto,

lanza al mercado el glifosato con estudios previos de toxicidad que lo califican como “seguro” desde el punto de vista ambiental principalmente por ser de baja toxicidad para organismos no blanco (www.monsanto.com). Según nuestros resultados, el glifosato no es inocuo para el ambiente ya que los cuerpos de agua naturales se ven afectados directamente por su toxicidad como por los efectos indirectos que genera el herbicida en las comunidades biológicas. Si tenemos en cuenta la aplicación intensiva y recurrente de altas cantidades de glifosato, tanto en la Argentina como en toda la región de América Latina, y que la restauración de los ecosistemas acuáticos requiere medidas que pueden demorar varios años en manifestarse (Jeppesen *et al.* 2005, 2007a, b), estamos en condiciones de afirmar que el ambiente, actualmente y en el futuro, está corriendo un alarmante peligro y es fundamental la reclasificación de la toxicidad de este herbicida por parte de los organismos nacionales correspondientes como un paso fundamental para comenzar a modificar la actual situación. Si a este tema, agregamos el del uso de mezclas o “cócteles” de estos herbicidas con otros plaguicidas en general, la problemática se ve ampliamente magnificada.

Consideramos que los resultados aportados en esta tesis sobre los efectos del glifosato y algunos de sus formulados comerciales más utilizados en los cuerpos de agua dulce, son útiles a la hora de formar e informar a los usuarios directos de estos productos, ya que el **conocimiento** y la **educación** representan las herramientas más importantes para poder lograr un mejoramiento ambiental a largo plazo. La Comisión Nacional de Investigaciones sobre Agroquímicos del CONICET (CNIA-CONICET), en su Informe del 2009, “Evaluación de la Información Científica vinculada al glifosato y su incidencia en la salud humana y el ambiente”, concluye que *“Aunque existen estudios para evaluar el impacto del glifosato en las especies no blanco, la mayoría de ellos no consideran importantes aspectos ecológicos. Entre ellos, los impactos indirectos, los acumulativos, los de largo plazo, ni las reacciones sinérgicas que el agroquímico puede tener en el ecosistema y en las redes tróficas”*. La información generada debería servir también para desarrollar prácticas agrarias que aseguren un desarrollo sostenible, sin poner en peligro la calidad de los recursos hídricos en el futuro. En este sentido, de las Heras Ibáñez y Moreno Alcazar (2005) proponen que hay que prever la elaboración de códigos para que se pongan en práctica, y que tengan como objetivo fundamental la reducción de la contaminación ambiental en general y de las aguas, en particular. Por otro lado consideramos que el **control** por parte del Estado involucrando a todos los habitantes del país, juega un papel fundamental ya que es necesario garantizar la ejecución de estos códigos que protejan a la naturaleza.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hamid M. I., Källqvist T., Hessen D. O., Berge D. 1996. The use of field enclosure experiments to study the effect of pesticides on lake phytoplankton. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 2: 199–209.
- Albay M., Akcaalan R. 2003. Comparative study of periphyton colonisation on common reed (*Phragmites australis*) and artificial substrate in a shallow lake, Manyas, Turkey. *Hydrobiologia* 506–509: 531–540.
- Alberdi J. L., Sáenz M. E., Di Marzio W. D., Tortorelli M. C. 1996. Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 229–235.
- Ali A., Fletcher R. A. 1978. Phytotoxic action of glyphosate and amitrole on corn seedlings. *Canadian Journal of Botany* 56: 2196–2202.
- Allende L., Tell G., Zagarese H., Torremorell A., Pérez G., Bustingorry J., Escaray R., Izaguirre I. 2009. Phytoplankton and primary production in clear-vegetated, inorganic-turbid, and algal-turbid shallow lakes from the pampa plain (Argentina). *Hydrobiologia* 624: 45–60.
- Altenburger R., Boedecker W., Faust M., Grimme L. H. 1990. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals: Combination effect studies with pesticides in algal biotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 20: 98–114.
- American Publication Health Association. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition. Centennial Edition. APHA, American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington, DC, USA.
- Amorós I., Alonso J. L., Romaguera S., Carrasco J. M. 2007. Assessment of toxicity of a glyphosate-based formulation using bacterial systems in lake water. *Chemosphere* 67: 2221–2228.
- Anagnostidis K., Komárek J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes III. Oscillatoriales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie Supplement* 80: 327–472.

- Antón F. A., Laborda E., Deariz M. 1994. Acute toxicity of the herbicide glyphosate to fish. *Chemosphere* 28: 745–753.
- ArgenBio. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. (<http://www.argenbio.org>)
- Asselborn V. M. 2003. Bioecología y ultraestructura de microalgas indicadoras de contaminación de los ambientes acuáticos bajo efectos de plaguicidas de uso agrícola. Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur, Argentina, 225 pp.
- Asselborn V. M., Zalocar de Domitrovic Y. 1998. Efectos del herbicida glifosato sobre el crecimiento del alga verde *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta). *Revista Brasileira de Toxicologia* 11: 61–65.
- Austin A., Lang S., Pomeroy M. 1981. Simple methods for sampling periphyton with observations on sampler design criteria. *Hydrobiologia* 85: 33–47.
- Austin A. P., Harris G. E., Lucey W. P. 1991. Impact of an organophosphate herbicide (glyphosate[®]) on periphyton communities developed in experimental streams. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 47: 29–35.
- Azim M. E., Beveridge M. C. M., van Dam A. A., Verdegem M. C. J. 2005. Periphyton and aquatic production: an introduction. En: Azim M. E., Verdegem M. C. J., van Dam A. A., Beveridge M. C. M. (Eds.) *Periphyton Ecology, Exploitation and Management*. CABI Publishing, Cambridge, 1–13 pp.
- Barja B. C., dos Santos Afonso M. 2005. Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study. *Environmental Science & Technology* 39: 585–592.
- Barja B. C., Herszage J., dos Santos Afonso M. 2001. Iron(III)–phosphonate complexes. *Polyhedron* 20: 1821–1830.
- Battaglin W. A., Kolpin D. W., Scribner E. A., Kuivila K. M., Sandstrom M. W. 2005. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 2002. *Journal of the American Water Resources Association* 41: 323–332.

- Battaglin W. A., Rice K. C., Focazio M. J., Salmons S., Barry R. X. 2009. The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005–2006. *Environmental Monitoring and Assessment* 155: 281–307.
- Battarbee R. W. 1986. Diatom Analysis. En: Berglund B. E. (Ed.) *Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology*. J. Wiley & Sons, New York, USA, 527–570 pp.
- Begon M., Harper J. L., Townsend C. R. 1996. Ecology: individuals, populations and communities. Third edition. Blackwell Science Ltd, 1068 pp.
- Bell S. G., Codd G. A. 1996. Detection analysis and risk assessment of cyanobacterial toxins. En: Hester R. E., Harrison R. M. (Eds.) *Agricultural chemicals and the environment. Issues in environmental science and technology no. 5*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 109–122 pp.
- Ben-Aziz A., Koren E. 1974. Interference in carotenogenesis as a mechanism of action of the pyridazinone herbicide Sandoz 6706. *Plant Physiology* 54: 916–920.
- Berkovic A., Marino D., Lespade P., Ronco A. 2006. Análisis de pesticidas asociados al cultivo de soja en aguas y sedimentos de un sector productivo de la pampa ondulada. *Anales XXVI Congreso Argentino de Química*, San Luis, 8-053, 4 pp.
- Blanck H., Wallin G., Wängberg S. 1984. Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 8: 339–351.
- Bonnet J.-L., Bonnemoy F., Dusser M., Bohatier J. 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology* 22: 78–91.
- Bonnineau C., Guasch H., Proia L., Ricart M., Geiszinger A., Romaní A. M., Sabater S. 2010. Fluvial biofilms: a pertinent tool to assess β -blockers toxicity. *Aquatic Toxicology* 96: 225–233.

- Bonnineau C., Bonet B., Corcoll N., Guasch H. 2011. Catalase in fluvial biofilms: a comparison between different extraction methods and example of application in a metal-polluted river. *Ecotoxicology* 20: 293–303.
- Bothwell M. L. 1985. Phosphorus limitation of lotic periphyton growth rates: an intersite comparison using continuous-flow troughs (Thompson River System, British Columbia). *Limnology and Oceanography* 30: 527–542.
- Botta F., Lavison G., Couturier G., Alliot F., Moreau-Guigon E., Fauchon N., Guery B., Chevreuil M., Blanchoud H. 2009. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere* 77: 133–139.
- Bourrelly P. 1970. Les algues d'eau douce. III: Les algues bleues et rouges. N. Boubée, París, 512 pp.
- Bourrelly P. 1972. Les algues d'eau douce. I: Les algues vertes. N. Boubée, París, 572 pp.
- Bourrelly P. 1981. Les algues d'eau douce. II: Les algues jaunes et bruns. N. Boubée, París, 517 pp.
- Bowmer K. H. 1982. Adsorption characteristics of seston in water: implications for the use of aquatic herbicides. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 33: 443–458.
- Boyle T. P., Fairchild J. F. 1997. The role of mesocosm studies in ecological risk analysis. *Ecological Applications* 7: 1099–1102.
- Bozeman J., Koopman B., Bitton G. 1989. Toxicity testing using immobilized algae. *Aquatic Toxicology* 14: 345–352.
- Brandt K. K., Jørgensen N. O. G., Nielsen T. H., Winding A. 2004. Microbial community-level toxicity testing of linear alkylbenzene sulfonates in aquatic microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* 49: 229–241.
- Brodeur J. C. 2010. La soja y sus agroquímicos: evaluando impactos en anfibios. En: Camino M., Aparicio V. (Eds.) *Taller Aspectos ambientales del uso de glifosato*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA, 65–71 pp.

- Burkholder J. M. 1996. Interactions of benthic algae with their substrata. En: Stevenson R. J., Bothwell M. L., Lowe R. L. (Eds.) *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA, 253–297 pp.
- Burkholder J. M., Wetzel R. G. 1990. Epiphytic alkaline phosphatase on natural and artificial plants in an oligotrophic lake: re-evaluation of the role of macrophytes as a phosphorus source for epiphytes. *Limnology and Oceanography* 35: 736–746.
- Burns E. R., Buchanan G. A., Mason C. C. 1971. Inhibition of carotenoid synthesis as a mechanism of action of amitrole, dichlormate, and pyriclor. *Plant Physiology* 47: 144–148.
- Calabrese E. J., Baldwin L. A. 2002. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology* 21: 91–97.
- Campbell W. F., Evans J. O., Reed S. C. 1976. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. *Weed Science* 24: 22–25.
- Carignan R., Kalff J. 1982. Phosphorus release by submerged macrophytes: Significance to epiphyton and phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 27: 419–427.
- Carlisle S. M., Trevors J. T. 1988. Glyphosate in the environment. *Water, Air, and Soil Pollution* 39: 409–420.
- Carmichael W. W. 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* 270: 78–86.
- Caron D. A. 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanophytoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Applied Environmental Microbiology* 46: 491–498.
- Carriquiriborde P. 2010. Toxicidad de glifosato en peces autóctonos: estudios de laboratorio y campo. En: Camino M., Aparicio V. (Eds.) *Taller Aspectos ambientales del uso de glifosato*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA, 53–64 pp.
- Carriquiriborde P., Ronco A. 2006. Ecotoxicological studies on the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces Atherinopsidae). *Biocell* 30: 97–109.

- CASAFE. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. (<http://www.casafe.org>)
- CASAFE. 2010. Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios 2009. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires, Argentina.
- Castro J. V. Jr. , Peralba M. C. R., Ayub M. A. Z. 2007. Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 42: 883–886.
- Cattaneo A., Kalff J. 1979. Primary production of algae growing on natural and artificial aquatic plants: a study of interactions between epiphytes and their substrate. *Limnology and Oceanography* 24: 1031–1037.
- Cattaneo A., Kalff J. 1986. The effect of grazer size manipulation on periphyton communities. *Oecologia* 69: 612–617.
- Cauble K., Wagner R. S. 2005. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75: 429–435
- Cavalcante D. G. S. M., Martinez C. B. R., Sofia S. H. 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research* 655: 41–46.
- Cedergreen N., Streibig J. C. 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Management Science* 61: 1152–1160.
- Cedergreen N., Streibig J. C., Kudsk P., Mathiassen S. K., Duke S. O. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-Response* 5:150–162.
- CNIA-CONICET 2009. Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos–Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, 130 pp.
- Comes R. D., Bruns V. F., Kelley A. D. 1976. Residues and persistence of glyphosate in irrigation water. *Weed Science* 24: 47–50.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONABIA. Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria. (<http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/areas/biotecnologia/20-CONABIA/index.php>)
- Cosgrove J., Walter D., Morrison P., Hillman K. 2004. Periphyton indicate effects of freshwater discharge in the near-coastal zone, Perth (Western Australia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 61: 331–338.
- Costa M. J., Monteiro D. A., Oliveira-Neto A. L., Rantin F. T., Kalinin A. L. 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicology* 17: 153–163.
- Cox C. 1995. Glyphosate, Part 1: Toxicology. *Journal of Pesticide Reform* 15: 14–20.
- Crisci J. V., López Armengol M. F. 1983. Introducción a la taxonomía numérica. Organización de los Estados Americanos, OEA. Washington, USA, 132 pp.
- Chan K., Leung S. C. 1986. Effects of paraquat and glyphosate on growth, respiration, and enzyme activity of aquatic bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 52–59.
- Chen C. Y., Hathaway K. M., Folt C. L. 2004. Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 823–831.
- Christy S. L., Karlander E. P., Parochetti J. V. 1981. Effects of glyphosate on the growth rate of *Chlorella*. *Weed Science* 29: 5–7.
- Daam M. A., Rodrigues A. M. F., Van den Brink P. J., Nogueira A. J. A. 2009. Ecological effects of the herbicide linuron in tropical freshwater microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 410–423.
- D'Aiuto P. E., Makarewicz J. C., Bosch I. 2006. The impact of stream nutrient loading on macrophytes and metaphyton in Conesus Lake, USA. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 29: 1373–1376.
- Danilov R. A., Ekelund N. G. A. 2001. Comparison of usefulness of three types of artificial substrata (glass, wood and plastic) when studying settlement patterns

- of periphyton in lakes of different trophic status. *Journal of Microbiological Methods* 45: 167–170.
- de las Heras Ibáñez J., Moreno Alcazar J. L. 2005. La calidad del agua. Contaminación de las aguas producida por la agricultura. Limitaciones para su uso en la agricultura. En: Martín de Santa Olalla Mañas F., López Fuster P., Calera Belmonte A. (Eds.) *Agua y Agronomía*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 609 pp.
- deNoyelles F., Kettle W. D., Sinn D. E. 1982. The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. *Ecology* 63: 1285–1293.
- Desikachary T. 1959. Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research. New Delhi, 104 pp.
- Deutschman D. H. 2001. Design and analysis of biodiversity field experiments. *Ecological Research* 16: 833–843.
- Dick R. E., Quinn J. P. 1995. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 545–550.
- Dill G. M. 2005. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science* 61: 219–224.
- Dill G. M., CaJacob C. A., Padgett S. R. 2008. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Management Science* 64: 326–331.
- Dodds W. K. 1991. Community interactions between the filamentous alga *Cladophora glomerata* (L.) Kuetzing, its epiphytes, and epiphyte grazers. *Oecologia* 85: 572–580.
- Dodds W. K., Gudder D. A. 1992. The ecology of *Cladophora*. *Journal of Phycology* 28: 415–427.
- Dukatz F., Ferrari R., Canziani G. 2006. Evaluación de sistemas lacunares bonaerenses mediante imágenes Landsat TM. *Biología Acuática* 22: 95–101.

- Duke S. O. 1988. Glyphosate. En: Kearney P. C., Kaufman D. D. (Eds.) *Herbicides: chemistry, degradation and mode of action*. Marcel Dekker, New York, USA, 2–70 pp.
- Duke S. O., Powles S. B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64: 319–325.
- Duke S. O., Baerson S. R., Rimando A. M. 2003. Herbicides: glyphosate. En: Plimmer J. R., Gammon D. W., Ragsdale N. N. (Eds.) *Encyclopedia of agrochemicals*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Dutra B. K., Fernandes F. A., Failace D. M., Oliveira G. T. 2011. Effect of Roundup® (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicology* 20: 255–263.
- Eberbach P. 1998. Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) in four soils. *Pesticide Science* 52: 229–240.
- Edwards W. M., Triplett Jr. G. B., Kramer R. M. 1980. A watershed study of glyphosate transport in runoff. *Journal of Environmental Quality* 9: 661–665.
- Ehling-Schulz M., Bilger W., Scherer S. 1997. UV-B-Induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Bacteriology* 179: 1940–1945.
- Fairchild J. F., Sappington L. C. 2002. Fate and effects of the triazinone herbicide metribuzin in experimental pond mesocosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43: 198–202.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (<http://www.fao.org>)
- Faust M., Altenburger R., Boedeker W., Grimme L. H. 1994. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 134–141.
- Faust M., Altenburger R., Backhaus T., Blanck H., Boedeker W., Gramatica P., Hamer V., Scholze M., Vighi M., Grimme L. H. 2001. Predicting the joint algal toxicity of

- multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology* 56: 13–32.
- Feng J. C., Thompson D. G., Reynolds P. 1990. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 1. Aquatic residues and off-target deposit assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1110–1118.
- Fitzgerald G. P. 1969. Some factors in the competition or antagonism among bacteria, algae, and aquatic weeds. *Journal of Phycology* 5: 351–359.
- Folmar L. C. 1978. Avoidance chamber responses of mayfly nymphs exposed to eight herbicides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 19: 312–318.
- Folmar L. C., Sanders H. O., Julin A. M. 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 8: 269–278.
- Fong P., Zedler J. B. 1993. Temperature and light effects on the seasonal succession of algal communities in shallow coastal lagoons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 171: 259–272.
- Forlani G., Pavan M., Gramek M., Kafarski P., Lipok J. 2008. Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. *Plant and Cell Physiology* 49: 443–456.
- Franz J. E., Mao M. K., Sikorski J. A. 1997. Glyphosate. A unique global herbicide. ACS Monographs 189, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 600 pp.
- Fuma S., Ishii N., Takeda H., Miyamoto K., Yanagisawa K., Doi K., Kawaguchi I., Tanaka Y., Inamori Y., Polikarpov G. G. 2009. Effects of acute γ -irradiation on the aquatic microbial microcosm in comparison with chemicals. *Journal of Environmental Radioactivity* 100: 1027–1033.
- Gabor T. S., Murkin H. R., Stainton M. P., Boughen J. A., Titman R. D. 1994. Nutrient additions to wetlands in the Interlake region of Manitoba, Canada: effects of a single pulse addition in spring. *Hydrobiologia* 279/280: 497–510.

- García C. M., Niell F. X. 1993. Seasonal change in a saline temporary lake (Fuente de Piedra, southern Spain). *Hydrobiologia* 267: 211–223.
- Gardner S. C., Grue C. E., Grassley J. M., Lenz L. A., Lindenauer J. M., Seeley M. E. 1997. Single species algal (*Ankistrodesmus*) toxicity tests with Rodeo® and Garlon® 3a. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 59: 492–499.
- Gasnier C., Dumont C., Benachour N., Clair E., Chagnon M.-C., Séralini G.-E. 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262: 184–191.
- Geitler L. 1932. Cyanophyceae. Kryptogamen-Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz, 14. Akademische Verlagsges, Leipzig, 1196 pp.
- Genter R. B., Cherry D. S., Smith E. P., Cairns J. Jr. 1987. Algal-periphyton population and community changes from zinc stress in stream mesocosms. *Hydrobiologia* 153: 261–275.
- Geoffroy L., Frankart C., Eullaffroy P. 2004. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environmental Pollution* 131: 233–241.
- Giesy J. P., Dobson S., Solomon K. R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Review of Contamination and Toxicology* 167: 35–120.
- Gimsing A. L., dos Santos Afonso M. 2005. Glyphosate. En: Nowack B., VanBriesen J. M. (Eds.) *Biogeochemistry of Chelating Agents*. ACS Symposium Series 910, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 263–277 pp.
- Ginzburg B. Z., Ginzburg M. 1985. Studies of the comparative physiology of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Volvocales). *European Journal of Phycology* 20: 277–283.
- Glass R. L. 1987. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 497–500.
- Goldsborough L. G., Beck A. E. 1989. Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds. *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 18: 537–544.

- Goldsborough L. G., Brown D. J. 1988. Effect of glyphosate (Roundup® formulation) on periphytic algal photosynthesis. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 41: 253–260.
- Goldsborough L. G., Brown D. J. 1993. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 1139–1147.
- Goldsborough L. G., Robinson G. G. C. 1996. Periphyton patterns in wetlands. En: Stevenson R. J., Bothwell M. L., Lowe R. J. (Eds.) *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA, 77–117 pp.
- Goldsborough L. G., McDougal R. L., North A. K. 2005. Periphyton in freshwater lakes and wetlands. En: Azim M. E., Verdegem M. C. J., van Dam A. A., Beveridge M. C. M. (Eds.) *Periphyton Ecology, Exploitation and Management*. CABI Publishing, Cambridge, 71–83 pp.
- Green B. R., Pichersky E., Kloppstech K. 1991. Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family. *Trends in Biochemical Sciences* 16: 181–186.
- Gresshoff P. M. 1979. Growth inhibition by glyphosate and reversal of its action by phenylalanine and tyrosine. *Australian Journal of Plant Physiology* 6: 177–185.
- Gross E. M., Feldbaum C., Graf A. 2003. Epiphyte biomass and elemental composition on submersed macrophytes in shallow eutrophic lakes. *Hydrobiologia* 506–509: 559–565.
- Guasch H., Muñoz I., Rosés N., Sabater S. 1997. Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. *Journal of Applied Phycology* 9: 137–146.
- Guasch H., Atli G., Bonet B., Corcoll N., Leira M., Serra A. 2010. Discharge and the response of biofilms to metal exposure in Mediterranean rivers. *Hydrobiologia* 657: 143–157.
- Gustavson K., Møhlenberg F., Schlüter L. 2003. Effects of exposure duration of herbicides on natural stream periphyton communities and recovery. *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 45: 48–98.

- Hance R. 1976. Adsorption of glyphosate by soils. *Pesticide Science* 7: 363–366.
- Hanke I., Wittmer I., Bischofberger S., Stamm C., Singer H. 2010. Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. *Chemosphere* 81: 422–429.
- Harker M., Young A. J. 1995. Inhibition of astaxanthin synthesis in the green alga, *Haematococcus pluvialis*. *European Journal of Phycology* 30: 179–187.
- Harte J., Holdren C., Schneider R., Shirley C. 1991. Guía de las sustancias contaminantes. En: *El libro de los tóxicos de la A a la Z*. Ed. Grijalbo, Argentina, 642 pp.
- Hartman W. A., Martin D. B. 1984. Effect of suspended bentonite clay on the acute toxicity of glyphosate to *Daphnia pulex* and *Lemna minor*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 33: 355–361.
- Hartman W. A., Martin D. B. 1985. Effects of four agricultural pesticides on *Daphnia pulex*, *Lemna minor*, and *Potamogeton pectinatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 35: 646–651.
- Harvey R. W., Smith R. L., George L. 1984. Effect of organic contamination upon microbial distributions and heterotrophic uptake in a Cape Cod, Mass., aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 1197–1202.
- Hawley G. R. W., Whitton B. 1991. Survey of algal picoplankton from lakes in five continents. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnology* 24: 1220–1222.
- Henry C. J., Higgins K. F., Buhl K. J. 1994. Acute toxicity and hazard assessment of Rodeo[®], X-77 Spreader[®], and Chem-Trol[®] to aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27: 392–399.
- Hernando F., Royuela M., Muñoz-Rueda A., Gonzalez-Murua C. 1989. Effect of glyphosate on the greening process and photosynthetic metabolism in *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Plant Physiology* 134: 26–31.
- Hess F. D. 1980. A *Chlamydomonas* algal bioassay for detecting growth inhibitor herbicides. *Weed Science* 28: 515–520.

- Hiebert F. K., Bennett P. C. 1992. Microbial control of silicate weathering in organic-rich ground water. *Science* 258: 278–281.
- Hikosaka K., Terashima I. 1995. A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C₃ plants to sun and shade with respect to nitrogen use. *Plant, Cell and Environment* 18: 605–618.
- Hildebrand L. D., Sullivan D. S., Sullivan T. P. 1980. Effects of Roundup[®] herbicide on populations of *Daphnia magna* in a forest pond. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 25: 353–357.
- Hildebrand L. D., Sullivan D. S., Sullivan T. P. 1982. Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup[®] herbicide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11: 93–98.
- Hoagland R. E., Duke S. O. 1982. Biochemical effects of glyphosate [*N*-(phosphonomethyl)glycine]. ACS Symposium Series 181, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 175–205 pp.
- Hoagland K. D., Carder J. P., Spawn R. L. 1996. Effects of organic toxic substances. En: Stevenson R. J., Bothwell M. L., Lowe R. L. (Eds.) *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA, 469–496 pp.
- Holtby L. B., Baillie S. J. 1989. Effects of the herbicide Roundup (glyphosate) on periphyton in Carnation Creek, British Columbia. En: Reynolds P. E. (Ed.) *Proceedings of the Carnation Creek Herbicide Workshop*, Forestry Canada, Victoria, Canada, 224–231 pp.
- Hurley J. P. 1988. Analysis of aquatic pigments by high performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Purification* 3: 12–16.
- Hustedt F. 1930. Bacillariophyta (Diatomeae). En: Pascher A. (Ed.) *Die Süßwasserflora von Mitteleuropa*, 10. Gustave Fischer, Jena, 466 pp.
- Hustedt F. 1942. Diatomeen. En: Huber-Pestalozzi G. (Ed.) *Das Phytoplankton des Süßwassers*. Schwerzerbart'sche Verlags-buchhandlung, Stuttgart, 16: 367–549.

- Izaguirre I., Vinocur A. 1994. Typology of shallow lakes of the Salado River basin (Argentina), based on phytoplankton communities. *Hydrobiologia* 277: 49–62.
- James C. 2009. Global status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA: Ithaca, NY, USA.
- Jeppesen E., Søndergaard M., Jensen J. P., Havens K. E., Anneville O., Carvalho L., Coveney M. F., Deneke R., Dokulil M. T., Foy B., Gerdeaux D., Hampton S. E., Hilt S., Kangur K., Köhler J., Lammens E. H. H. R., Lauridsen T. L., Manca M., Miracle M. R., Moss B., Nöges P., Persson G., Phillips G., Portielje R., Romo S., Schelske C. L., Straile D., Tatrai I., Willén E., Winder M. 2005. Lake responses to reduced nutrient loading – an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshwater Biology* 50: 1747–1771.
- Jeppesen E., Meerhoff M., Jacobsen B. A., Hansen R. S., Søndergaard M., Jensen J. P., Lauridsen T. L., Mazzeo N., Branco C. W. C. 2007a. Restoration of shallow lakes by nutrient control and biomanipulation—the successful strategy varies with lake size and climate. *Hydrobiologia* 581: 269–285.
- Jeppesen E., Søndergaard M., Meerhoff M., Lauridsen T. L., Jensen J. P. 2007b. Shallow lake restoration by nutrient loading reduction—some recent findings and challenges ahead. *Hydrobiologia* 584: 239–252.
- Jergentz S., Pessacq P., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. 2004. Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 133–141.
- Jergentz S., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61: 817–826.
- José de Paggi S. B., Devercelli M. 2010. Land use and basin characteristics determine the composition and abundance of the microzooplankton. *Water, Air, and Soil Pollution* DOI:10.1007/s11270-010-0626-3.
- Källqvist T., Abdel-Hamid M. I., Berge D. 1994. Effects of agricultural pesticides on freshwater plankton communities in enclosures. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* 13(Supplement): 133–152.

- Kelly D. W., Poulin R., Tompkins D. M., Townsend C. R. 2010. Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *Journal of Applied Ecology* 47: 498–504.
- Kiffney P. M., Richardson J. S., Bull J. P. 2003. Responses of periphyton and insects to experimental manipulation of riparian buffer width along forest streams. *Journal of Applied Ecology* 40: 1060–1076.
- Kimbrough R. A., Litke D. W. 1996. Pesticides in streams draining agricultural and urban areas in Colorado. *Environmental Science & Technology* 30: 908–916.
- Kirk J. T. O. 1994. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 509 pp.
- Kish P. A. 2006. Evaluation of herbicide impact on periphyton community structure using the Matlock periphytometer. *Journal of Freshwater Ecology* 21: 341–348.
- Kitajima K., Hogan K. P. 2003. Increases of chlorophyll *a/b* ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant, Cell and Environment* 26: 857–865.
- Kjær J., Olsen P., Ullum M., Grant R. 2005. Leaching of glyphosate and amino-methylphosphonic acid from danish agricultural field sites. *Journal of Environmental Quality* 34: 608–620.
- Klapwijk S. P., de Boer T. F., Rijs M. J. 1983. Effects of agricultural wastewater on benthic algae in ditches in the Netherlands. En: Wetzel R. G. (Ed.) *Periphyton of freshwater ecosystems*. Dr. W. Junk Publishers, The Hage, Netherlands, 311–319 pp.
- Kolpin D. W., Thurman E. M., Lee E. A., Meyer M. T., Furlong E. T., Glassmeyer S. T. 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment* 354: 191–197.
- Komárek J., Anagnostidis K. 1999. Cyanoprokariota. 1. Teil: Chroococcales. En: Ettl H., Gärtner G., Heynig H, Mollenhauer D. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustave Fischer, Jena, 548 pp.

- Krammer K., Lange-Bertalot H. 1986. Bacillariophyceae. 1. Naviculaceae. En: Ettl H., Gerloff J., Heying H., Mollenhauer D. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustave Fischer, Jena, 876 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H. 1988. Bacillariophyceae. 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. En: Ettl H., Gerloff J., Heying H., Mollenhauer D. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustave Fischer, Jena, 596 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H. 1991a. Bacillariophyceae. 3. Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. En: Ettl H., Gerloff J., Heying H., Mollenhauer D. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustave Fischer Verlag, Jena, 576 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H. 1991b. Bacillariophyceae. 4. Achnanthaceae, Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolate) und Gomphonema. En: Ettl H., Gerloff J., Heying H., Mollenhauer D. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa 2/4*. Gustave Fischer Verlag, Jena, 437 pp.
- Kreutzweiser D. P., Kingsbury P. D., Feng J. C. 1989. Drift response of stream invertebrates to aerial applications of glyphosate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 42: 331–338.
- Krinsky N. I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine* 7: 617–635.
- Kwandrans J., Eloranta P., Kawecka B., Wojtan K. 1998. Use of benthic diatom communities to evaluate water quality in rivers of southern Poland. *Journal of Applied Phycology* 10: 193–201.
- Lajmanovich R. C., Sandoval M. T., Peltzer P. M. 2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 612–618.
- Lajmanovich R. C., Attademo A. M., Peltzer P. M., Junges C. M., Cabagna M. C. 2011. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60: 681–689.

- Landry D., Dousset S., Fournier J.-C., Andreux F. 2005. Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards (Vosne-Romanée, 21-France). *Environmental Pollution* 138: 191–200.
- Lane C. M., Taffs K. H., Corfield J. L. 2003. A comparison of diatom community structure on natural and artificial substrata. *Hydrobiologia* 493: 65–79.
- Lange-Bertalot H. 1979. Pollution and tolerance of diatoms as criterion of water quality estimation. *Nova Hedwigia* 64: 285–304. En: Gómez N. 1998. Use of epipellic diatoms for evaluation of water quality in the Matanza-Riachuelo (Argentina), a pampean plain river. *Water Research* 32: 2029–2034.
- Langiano V. C., Martinez C. B. R. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147: 222–231.
- Laurion I., Lami A., Sommaruga R. 2002. Distribution of mycosporine-like amino acids and photoprotective carotenoids among freshwater phytoplankton assemblages. *Aquatic Microbial Ecology* 26: 283–294.
- Leclercq L., Maquet B. 1987. Deux nouveaux indices diatomique et de qualité existants. *Cahiers de Biologie Marine* 28: 303–310. En: Lowe R. L., Pan Y. 1996. Benthic algal communities as biological monitors. En: Stevenson R. J., Bothwell M. L., Lowe R. L. (Eds.) *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA, 705–740 pp.
- Ledger M. E., Hildrew A. G. 1998. Temporal and spatial variation in the epilithic biofilm of an acid stream. *Freshwater Biology* 40: 655–670.
- Liboriussen L., Jeppesen E. 2003. Temporal dynamics in epipellic, pelagic and epiphytic algal production in a clear and a turbid shallow lake. *Freshwater Biology* 48: 418–431.
- Lichtenthaler H. K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 349–382.
- Linz G. M., Blixt D. C., Bergman D. L., Bleier W. J. 1996. Responses of Red-winged Blackbirds, Yellow-headed Blackbirds and Marsh Wrens to glyphosate-induced alterations in cattail density. *Journal of Field Ornithology* 67: 167–176.

- Lipok J., Owsiak T., Młynarz P., Forlani G., Kafarski P. 2007 Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates-the ability of *Spirulina* spp. to degrade glyphosate. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 286–291.
- Lipok J., Studnik H., Gruyaert S. 2010. The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1681–1688.
- Liu H., Xiong M. 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquatic Toxicology* 93: 100–106.
- Liu C. M., McLean P. A., Sookdeo C. C., Cannon F. C. 1991. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1799–1804.
- Lockhart W. L., Billeck B. N., Baron C. L. 1989. Bioassays with a floating aquatic plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia* 188/189: 353–359.
- Lodge D. M., Blumenshine S. C., Vadeboncoeur Y. 1998. Insights and application of large-scale, long-term ecological observations and experiments. En: Resetarits Jr. W. J., Bernardo J. (Eds.) *Experimental ecology: Issues and perspectives*. Oxford University Press, New York, USA, 202–235 pp.
- Lopretto E. C., Tell G. 1995. Ecosistemas de aguas continentales. Ediciones Sur, La Plata, Argentina, 1401 pp.
- Lowe R. L., Pan Y. 1996. Benthic algal communities as biological monitors. En: Stevenson R. J., Bothwell M. L., Lowe R. L. (Eds.) *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA, 705–740 pp.
- Lund-Høie K., Friestad H. O. 1986. Photodegradation of the herbicide glyphosate in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 723–729.
- Lydon J., Duke S. O. 1988. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 813–818.

- Ma J. 2002. Differential sensitivity to 30 herbicides among populations of two green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68: 275–281.
- Ma J., Liang W., Xu L., Wang S., Wei Y., Lu J. 2001. Acute toxicity of 33 herbicides to the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66: 536–541.
- Ma J., Xu L., Wang S., Zheng R., Jin S., Huang S., Huang Y. 2002. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 128–132.
- Ma J., Lin F., Wang S., Xu L. 2003. Toxicity of 21 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71: 594–601.
- Ma J., Wang S., Wang P., Ma L., Chen X., Xu R. 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 456–462.
- Maitre M. I., Lorenzatti E. A., Lenardón M. A., Enrique S. N. 2008. Adsorción-desorción de glifosato en dos suelos argentinos. *Natura Neotropicalis* 39: 19–31.
- Maitre M. I., Lorenzatti E. A., Lenardón M. A., Enrique S. N. 2010. Análisis de residuos de glifosato en muestras ambientales y alimentos. En: Camino M., Aparicio V. (Eds.) *Taller Aspectos ambientales del uso de glifosato*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA, 27–30 pp.
- Major W. W. III, Grue C. E., Gardner S. C., Grassley J. M. 2003. Concentrations of glyphosate and AMPA in sediment following operational applications of Rodeo® to control Smooth cordgrass in Willapa Bay, Washington, USA. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71: 912–918.
- Mann R. M., Bidwell J. R. 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 193–199.

- Mann R. M., Hyne R. V., Choung C. B., Wilson S. P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157: 2903–2927.
- Mantoura R. F. C., Llewellyn C. A. 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 151: 297–314.
- Margalef R. 1969. El concepto de polución en limnología y sus indicadores biológicos. *Documentos de Investigación Hidrológica* 7: 103–133.
- Markelova A. G., Vladimirova M. G., Kuptsova E. S. 2000. A comparison of cytochemical methods for the rapid evaluation of microalgal viability. *Russian Journal of Plant Physiology* 47: 815–819.
- Marrs R. H., Williams C. T., Frost A. J., Plant R. A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution* 59: 71–86.
- Marrs R. H., Frost A. J., Plant R. A., Lunnis P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 45: 283–293.
- Martin M. L., Sobrero C., Rivas C., Rimoldi F., Ronco A. 2003. Impacto del uso de pesticidas asociado a la siembra directa sobre especies no-blanco. Flora riparia y acuática. *Conferencia Internacional Usos Múltiples del Agua: Para la Vida y el Desarrollo Sostenible*. Universidad del Valle, Instituto Cinara, 27–31 pp.
- Masson S., Pinel-Allou B., Smith B. H. 2000. Total phosphorus–chlorophyll *a* size fraction relationships in southern Québec lakes. *Limnology and Oceanography* 45: 732–740.
- Maule A., Wright S. J. L. 1984. Herbicide effects on the population growth of some green algae and cyanobacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 57: 369–379.
- Maurice C. G., Lowe R. L., Burton T. M., Stanford R. M. 1987. Biomass and compositional changes in the periphytic community of an artificial stream in response to lowered pH. *Water, Air, and Soil Pollution* 33: 165–177.

- McConnell J. S., Hossner L. R. 1989. X-ray diffraction and infrared spectroscopic studies of adsorbed glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 555–560.
- McDougal R. L., Goldsborough L. G. 1995. Responses of wetland algae and macrophytes to press and pulse additions of inorganic nitrogen and phosphorus. University Field Station (Delta Marsh) Annual Report 29: 117–126.
- McNair S. A., Chow-Fraser P. 2003. Change in biomass of benthic and planktonic algae along a disturbance gradient for 24 Great Lakes coastal wetlands. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60: 676–689.
- Meier P. G., O'Connor D., Dilks D. 1983. Artificial substrata for reducing periphytic variability on replicated samples. En: Wetzel R. G. (Ed.) *Periphyton of freshwater ecosystems*, Dr. W. Junk Publishers, The Hague, 283–286 pp.
- Melis A. 1991. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1058: 87–106.
- Meyer B., Paillet J.-Y., Guignard C., Hoffmann L., Krein A. 2010. Concentrations of dissolved herbicides and pharmaceuticals in a small river in Luxembourg. *Environmental Monitoring and Assessment* DOI: 10.1007/s10661-010-1777-9.
- Miles C. J., Wallace L. R., Moye H. A. 1986. Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl) phosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic labeling with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 69: 458–461.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (<http://www.minagri.gob.ar/site/index.php>)
- Mitchell D. G., Chapman P. M., Longs T. J. 1987. Acute toxicity of Roundup® and Rodeo® herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 1028–1035.
- Montenegro A. K. A., Crispim M. C., Torelli J., Marinho R. S. A. 2006. The influence of the methodology in the results of food diet analysis of *Steindachnerina notonota* (Miranda Ribeiro, 1937), in Taperoá II Dam, Paraíba State. *Revista de Biologia e Ciências da Terra, Suplemento Especial* 1: 180–191.

- Morgan M. J., Kiceniuk J. W. 1992. Response of rainbow trout to a two month exposure to Vision[®], a glyphosate herbicide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 48: 772–780.
- Mossman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55–63.
- Mudge S. M., Seguel C. G. 1999. Organic contamination of San Vicente Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin* 38: 1011–1021.
- Mugni H., Jergentz S., Schulz R., Maine A., Bonetto C. 2005. Phosphate and nitrogen compounds in streams of Pampean Plain areas under intensive cultivation (Buenos Aires, Argentina). En: Serrano H., Golterman H. L. (Eds.) *Phosphates in sediments*. Backhuys Publishers, The Netherlands, 163–170 pp.
- Mugni H., Demetrio P., Marino D., Ronco A., Bonetto C. 2010. Toxicity persistence following an experimental cypermethrin and chlorpyrifos application in pampasic surface waters (Buenos Aires, Argentina). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84: 524–528.
- Murkin H. R., Pollard J. B., Stainton M. P., Boughen J. A., Titman R. D. 1994. Nutrient additions to wetlands in the Interlake region of Manitoba, Canada: effects of periodic additions throughout the growing season. *Hydrobiologia* 279/280: 483–495.
- Natale G. S., Ronco A. E. 2003. Impacto del uso de pesticidas asociado a la siembra directa sobre especies no-blanco. Anuros autóctonos. *Conferencia Internacional Usos Múltiples del Agua: Para la Vida y el Desarrollo Sostenible*. Universidad del Valle, Instituto Cinara, 36–39 pp.
- Neškovic N. K., Poleksic V., Elezovic I., Karan V., Budimir M. 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on Carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 295–302.
- Newton M., Howard K. M., Kelpsas B. R., Danhaus R., Lottman C. M., Dubelman S. 1984. Fate of glyphosate in an Oregon forest ecosystem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 1144–1151.

- Newton M., Horner L. M., Cowell J. E., White D. E., Cole E. C. 1994. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in north American forests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1795–1802.
- Nicholls C. I., Altieri M. A. 1997. Conventional agricultural development models and the persistence of the pesticide treadmill in Latin America. *International Journal of Sustainable Development & World Ecology* 4: 93–111.
- Nielsen L. W., Dahllöf I. 2007. Direct and indirect effects of the herbicides glyphosate, bentazone and MCPA on eelgrass (*Zostera marina*). *Aquatic Toxicology* 82: 47–54.
- Nomura N. S., Hilton H. W. 1977. The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils. *Weed Research* 17: 113–121.
- Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R., Bechara E. J. H., Colepicolo P. 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 18–24.
- Öncel I., Keleş Y., Üstün A. S. 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environmental Pollution* 107: 315–320.
- Orset S., Young A. J. 1999. Low-temperature-induced synthesis of α -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 35: 520–527.
- Paganelli A., Gnazzo V., Acosta H., López S. L., Carrasco A. E. 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology* 23: 1586–1595.
- Palma G., Sánchez A., Olave Y., Encina F., Palma R., Barra R. 2004. Pesticide levels in surface waters in an agricultural–forestry basin in Southern Chile. *Chemosphere* 57: 763–770.
- Pan Y., Lowe R. L. 1994. Independent and interactive effects of nutrients and grazers on benthic algal community structure. *Hydrobiologia* 291: 201–209.

- Patrick R., Reimer C. 1966. The diatoms of United States. I. Monographs Acad. Nat. Sci. Philadelphia 13, 688 pp.
- Patrick R., Reimer C. 1975. The diatoms of United States. II. Monographs Acad. Nat. Sci. Philadelphia 13, 213 pp.
- Pätsikkä E., Aro E.-M., Tyystjärvi E. 1998. Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo. *Plant Physiology* 117: 619–627.
- Payne N. J. 1992. Off-target glyphosate from aerial silvicultural applications, and buffer zones required around sensitive areas. *Pesticide Science* 34: 1–8.
- Pechlaner R. 2002. Glyphosate in herbicides: an overlooked threat to microbial bottom-up processes in freshwater systems. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnology* 28: 1831–1835.
- Pérès F., Florin D., Grollier T., Feurtet-Mazel A., Coste M., Ribeyre F., Ricard M., Boudou A. 1996. Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *Environmental Pollution* 94: 141–152.
- Pérez G. L., Torremorell A., Mugni H., Rodríguez P., Vera M. S., do Nascimento M., Allende L., Bustingorry J., Escaray R., Ferraro M., Izaguirre I., Pizarro H., Bonetto C., Morris D. P., Zagarese H. 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications* 17: 2310–2322.
- Pérez G. L., Vera M. S., Miranda L. 2011. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. En: Kortekamp A. (Ed.) *Herbicides and Environment*. INTECH, Vienna, Austria, 343–368 pp.
- Perkins P. J., Boermans H. J., Stephenson G. R. 2000. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 940–945.
- Perschbacher P. W., Stone N., Ludwig G. M., Guy Jr. C. B. 1997. Evaluation of effects of common aerially-applied soybean herbicides and propanil on the plankton communities of aquaculture ponds. *Aquaculture* 157: 117–122.

- Peruzzo P., Marino D., Cremonte C., da Silva M., Porta A., Ronco A. 2003. Impacto de pesticidas en aguas superficiales y sedimentos asociado a cultivos por siembra directa. *Conferencia Internacional Usos Múltiples del Agua: Para la Vida y el Desarrollo Sostenible*. Universidad del Valle, Instituto Cinara, 135–142 pp.
- Peruzzo P. J., Porta A. A., Ronco A. E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156: 61–66.
- Pesce S., Fajon C., Bardot C., Bonnemoy F., Portelli C., Bohatier J. 2008. Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. *Aquatic Toxicology* 86: 352–360.
- Pesce S., Batisson I., Bardot C., Fajon C., Portelli C., Montuelle B., Bohatier J. 2009. Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1905–1912.
- Pessagno R. C., dos Santos Afonso M., Torres Sanchez R. M. 2005. N-(phosphonomethyl)glycine interections with soils. *The Journal of the Argentine Chemical Society* 93: 97–108.
- Pessagno R. C., Torres Sanchez R. M., dos Santos Afonso M. 2008. Glyphosate behavior at soil and mineral-water interfaces. *Environmental Pollution* 153: 53–59.
- Peterson R. K. D., Hulting A. G. 2004. A comparative ecological risk assessment for herbicides used on spring wheat: the effect of glyphosate when used within a glyphosate-tolerant wheat system. *Weed Science* 52: 834–844.
- Peterson H. G., Boutin C., Martin P. A., Freemark K. E., Ruecker N. J., Moody M. J. 1994. Aquatic phytotoxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicology* 28: 275–292.
- Pinhassi J., Sala M. M., Havskum H., Peters F., Guadayol C., Malits A., Marrasé C. 2004. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6753–6766.

- Pintilie M., Oprica L., Surleac M., Dragut Ivan C., Creanga D. E., Artenie V. 2006. Enzyme activity in plants treated with magnetic liquid. *Romanian Journal of Physics* 51: 239–244.
- Pipke R., Schulz A., Amrhein N. 1987. Uptake of Glyphosate by an *Arthrobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 974–978.
- Pizarro H., Alemanni M. E. 2005. Variables físico-químicas del agua y su influencia en la biomasa del perifiton en un tramo inferior del Río Luján (Provincia de Buenos Aires). *Ecología Austral* 15: 73–88.
- Pizarro H., Vinocur A., Tell G. 2002. Periphyton on artificial substrata from three lakes of different trophic status at Hope Bay (Antarctica). *Polar Biology* 25: 169–179.
- Popp M., Hann S., Mentler A., Fuerhacker M., Stinger G., Koellensperger G. 2008. Determination of glyphosate and AMPA in surface and waste water using high-performance ion chromatography coupled to inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry (HPIC–ICP–DRC–MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391:695–699.
- Porter K. C., Feig Y. S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943–948.
- Powell H. A., Kerby N. W., Rowell P. 1991. Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. *New Phytology* 119: 421–426.
- Powell H. A., Kerby N. W., Rowell P., Mousdale D. M., Coggins J. R. 1992. Purification and properties of a glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Planta* 188: 484–490.
- Pratt J. R., Melendez A. E., Barreiro R., Bowers N. J. 1997. Predicting the ecological effects of herbicides. *Ecological Applications* 7: 1117–1124.
- Pringle C. M. 1990. Nutrient spatial heterogeneity: effects on community structure, physiognomy, and diversity of stream algae. *Ecology* 71: 905–920.
- Qian H., Chen W., Sheng G. D., Xu X., Liu W., Fu Z. 2008. Effects of glufosinate on antioxidant enzymes, subcellular structure, and gene expression in the unicellular green alga *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology* 88: 301–307.

- Qian H., Chen W., Sun L., Jin Y., Liu W., Fu Z. 2009. Inhibitory effects of paraquat on photosynthesis and the response to oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology* 18: 537–543.
- Quirós R., Drago E. 1999. The environmental state of Argentinean lakes: an overview. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 4: 55–64.
- Quirós R., Rennella A. M., Boveri M. B., Rosso J. J., Sosnovsky A. 2002a. Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral* 12: 175–185.
- Quirós R., Rosso J. J., Rennella A., Sosnovsky A., Boveri M. 2002b. Análisis del estado trófico de las lagunas pampeanas (Argentina). *Interciencia* 27: 584–591.
- Quirós R., Boveri M. B., Petracchi C. A., Rennella A. M., Rosso J. J., Sosnovsky A., von Bernard H. T. 2006. Los efectos de la agriculturización del humedal pampeano sobre la eutrofización de sus lagunas. En: Tundisi J. G., Matsumura-Tundisi T., Sidagis Galli C. (Eds.) *Eutrofização na América do Sul: Causas, conseqüências e tecnologias de gerenciamento e controle*. Instituto Internacional de Ecologia, Instituto Internaciona de Ecologia e Gerenciamento Ambiental, Academia Brasileira de Ciências, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, InterAcademy Panel on International Issues, InterAmerican Network of Academies of Sciences, 1–16 pp.
- Rand G. M. 2004. Fate and effects of the insecticide–miticide chlorfenapyr in outdoor aquatic microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58: 50–60.
- Rankin L. M., Franzmann P. D., McMeekin T. A., Burton H. R. 1997. Seasonal distribution of picocyanobacteria in Ace Lake, a marine-derived Antarctic lake. En: Battaglia B., Valencia J., Walton D. W. H. (Eds.) *Antarctic communities, species, structure and survival*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 178–184 pp.
- Reger B. J., Krauss R. W. 1970. The photosynthetic response to a shift in the chlorophyll *a* to chlorophyll *b* ratio of *Chlorella*. *Plant Physiology* 46: 568–575.
- Relyea R. A. 2004. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1737–1742.

- Relyea R. A. 2005a. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15: 618–627.
- Relyea R. A. 2005b. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* 15: 1118–1124.
- Relyea R. A. 2005c. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48: 351–357.
- Relyea R. A. 2006. Letters to the editor: The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 16: 2027–2034.
- Relyea R. A. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159: 363–376.
- Relyea R., Hoverman J. 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters* 9: 1157–1171.
- Relyea R. A., Jones D. K. 2009. The toxicity of Roundup Original Max[®] to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 2004–2008.
- Relyea R. A., Schoeppner N. M., Hoverman J. T. 2005. Pesticides and amphibians: the importance of assemblage context. *Ecological Applications* 15: 1125–1134.
- Richard S., Moslemi S., Sipahutar H., Benachour N., Seralini G.-E. 2005. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives* 113: 716–720.
- Richardson J. T., Frans R. E., Talbert R. E. 1979. Reactions of *Euglena gracilis* to fluometuron, MSMA, metribuzin, and glyphosate. *Weed Science* 27: 619–624.
- Ringuelet R. 1972. Tipología de las lagunas de la Provincia de Buenos Aires. La Limnología Regional y los Tipos Lagunares. *Physis* 31: 55–76.
- Ringuelet R., Salibián A., Claverie E., Ilhero S. 1968. Limnología química de las Lagunas Pampásicas. *Physis* 17: 201–221.

- Robertson E. B., Bunting D. L. 1976. The acute toxicity of four herbicides to 0–4 hour nauplii of *Cyclops vernalis* Fisher (Copepoda, Cyclopoida). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 16: 682–688.
- Rohr J. R., Crumrine P. W. 2005. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications* 15: 1135–1147.
- Romero D. M., Ríos de Molina M. C., Juárez A. B. 2011. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 741–747.
- Ross C., Santiago-Vázquez L., Paul V. 2006. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology* 78: 66–73.
- Roy D. N., Konar S. K., Banerjee S., Charles D. A., Thompson D. G., Prasad R. 1989. Uptake and persistence of the herbicide glyphosate in fruit of wild blueberry and red raspberry. *Canadian Journal of Forest Research* 19: 842–847.
- Rueppel M. L., Brightwell B. B., Schaefer J., Marvel J. T. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25: 517–528.
- Sabater S., Guasch H., Ricart M., Romaní A., Vidal G., Klünder C., Schmitt-Jansen M. 2007. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 387: 1425–1434.
- Sáenz M. E., Di Marzio W. D. 2009. Ecotoxicidad del herbicida glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. *Limnetica* 28: 149–158.
- Sáenz M. E., Di Marzio W. D., Alberdi J. L., Tortorelli M. C. 1997. Effects of technical grade and a commercial formulation of glyphosate on algal population growth. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59: 638–644.
- Sáenz M. E., Di Marzio W. D., Alberdi J. L., Tortorelli M. C. 2001. Algal growth recovery studies after paraquat exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66: 263–268.

- Salisbury F. B., Ross C. W. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica, México D.F., 759 pp.
- Samuel K., Bose S. 1987. Bleaching of photosynthetic pigments in *Chlorella protothecoides* grown in the presence of SANDOZ 9785 (4-chloro-5-dimethylamino-2 phenyl-3 (2H) pyridazinone). *Journal of Biosciences* 12: 399–404.
- Sánchez M. L., Pizarro H., Tell G., Izaguirre I. 2010. Relative importance of periphyton and phytoplankton in turbid and clear vegetated shallow lakes from the Pampa Plain (Argentina): a comparative experimental study. *Hydrobiologia* 646: 271–280.
- Sand-Jensen K., Borum J. 1991. Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate freshwaters and estuaries. *Aquatic Botany* 41: 137–175.
- Sarma S. S. S., Corral-Jáquez F. I., Nandini S., Brena-Bustamante P. 2010. Population level indicators of stress: effects of two heavy metals (copper and mercury) on the growth of *Lecane quadridentata* (Ehrenberg, 1830) (Rotifera: Lecanidae). *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 45: 32–36.
- Sayuri Shiogiri N., Carraschi S. P., Cubo P., Lopes Schiavetti B., da Cruz C., Pitelli R. A. 2010. Ecotoxicity of glyphosate and aterbane[®] br surfactant on guaru (*Phalloceros caudimaculatus*). *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 32: 285–289.
- Schaffer J. D., Sebetich M. J. 2004. Effects of aquatic herbicides on primary productivity of phytoplankton in the laboratory. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72: 1032–1037.
- Scheffer M., Hosper S. H., Meijer M.-L., Moss B., Jeppesen E. 1993. Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 275–279.
- Schmitt-Jansen M., Altenburger R. 2005. Toxic effects of isoproturon on periphyton communities – a microcosm study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 62: 539–545.

- Schmitt-Jansen M., Altenburger R. 2008. Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation PAM fluorometry. *Aquatic Toxicology* 86: 49–58.
- Scribner E. A., Battaglin W. A., Dietze J. E., Thurman E. M. 2003. Reconnaissance data for glyphosate, other selected herbicides, their degradation products, and antibiotics in 51 streams in nine midwestern states, 2002. U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey. Open-File Report 03–217. Kansas, USA, 101 pp.
- Servizi J. A., Gordon R. W., Martens D. W. 1987. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia*, and trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 15–22.
- SETAC-RESOLVE. 1992. Workshop on aquatic microcosm for ecological assessment of pesticides. The SETAC Foundation for Environmental Education and Resolve (a program of the World Wildlife Fund), Wintergreen, Virginia, USA.
- Shinabarger D. L., Braymer H. D. 1986. Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. *Journal of Bacteriology* 168: 702–707.
- Shipitalo M. J., Malone R. W., Owens L. B. 2008. Impact of glyphosate-tolerant soybean and glufosinate-tolerant corn production on herbicide losses in surface runoff. *Journal of Environmental Quality* 37: 401–408.
- Simenstad C. A., Cordell J. R., Tear L., Weitkamp L. A., Paveglio F. L., Kilbridge K. M., Fresh K. L., Grue C. E. 1996. Use of Rodeo and X-77 spreader to control smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*) in a southwestern Washington estuary: 2. Effects on benthic microflora and invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 969–978.
- Sládečková A. 1990. Periphyton as indicator of the reservoir water quality III. Biomonitoring techniques. *Ergebnisse der Limnologie* 33: 775–782.
- Smith G. R. 2001. Effects of acute exposure to a commercial formulation of glyphosate on the tadpoles of two species of anurans. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* 67: 483–488.

- Smith N. J., Martin R. C., St. Croix R. G. 1996. Levels of the herbicide glyphosate in well water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 759–765.
- Sobrero C., Rimoldi F., Ronco A. 2007a. Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemna gibba* L. at different exposure levels and assessment end-points. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79: 537–543.
- Sobrero C., Martin M. L., Ronco A. 2007b. Fitotoxicidad del herbicida Roundup® Max sobre la especie no blanco *Lemna gibba* en estudios de campo y laboratorio. *Hidrobiológica* 17: 31–39.
- Solberg K. L., Higgins K. F. 1993. Effects of glyphosate herbicide on cattails, invertebrates, and waterfowl in South Dakota wetlands. *Wildlife Society Bulletin* 21: 299–307.
- Solomon K. R., Thompson D. G. 2003. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews* 6: 289–324.
- Solomon K. R., Anadón A., Carrasquilla G., Cerdeira A. L., Marshall J., Sanin L.-H. 2007. Coca and poppy eradication in Colombia: environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 190: 43–125.
- Southam C. M., Ehrlich J. 1943. Effects of extracts of western redcedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology* 33: 517–524. En: Calabrese E. J. 2005. Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution* 138: 378–411.
- Sprankle P. W., Meggitt F., Penner D. 1975a. Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Science* 23: 224–228.
- Sprankle P. W., Meggitt F., Penner D. 1975b. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science* 23: 229–234.

- Stachowski-Haberkorn S., Becker B., Marie D., Haberkorn H., Coroller L., de la Broise D. 2008. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquatic Toxicology* 89: 232–241.
- Steeman-Nielsen E. 1952. The use of radioactive carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil* 18: 117–140.
- Steinberg C., Schiefele S. 1988. Biological indication of trophy and pollution of running waters. *Zeitschrift für Wasser-und Abwasser-Forschung* 21: 227–234. En: Kwandrans J., Eloranta P., Kawecka B., Wojtan K. 1998. Use of benthic diatom communities to evaluate water quality in rivers of southern Poland. *Journal of Applied Phycology* 10: 193–201.
- Steinman A. D., McIntire C. D. 1990. Recovery of lotic periphyton communities after disturbance. *Environmental Management* 14: 589–604.
- Stevenson R. J. 1996. An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. En: Stevenson R. J., Bothwell M. L., Lowe R. L. (Eds.) *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA, 3–30 pp.
- Stewart P. M., Pratt J. R., Cairns J. Jr., Lowe R. L. 1985. Diatom and protozoan accrual on artificial substrates in lentic habitats. *Transactions of the American Microscopical Society* 104: 369–377.
- Stockner J. G. 1988. Phototrophic picoplankton: An overview from marine and freshwater ecosystems. *Limnology and Oceanography* 33: 765–775.
- Streit B. 1992. Bioaccumulation processes in ecosystems. *Experientia* 48: 955–970.
- Struger J., Thompson D., Staznik B., Martin P., McDaniel T., Marvin C. 2008. Occurrence of Glyphosate in Surface Waters of Southern Ontario. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80: 378–384.
- Stumm W., Morgan J. J. 1996. Aquatic chemistry. Chemical equilibria and rates in natural waters. Wiley, New York, USA, 1022 pp.

- Sullivan D. S., Sullivan T. P., Bisalputra T. 1981. Effects of Roundup herbicide on diatom populations in the aquatic environment of a coastal forest. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 26: 91–96.
- Sweeting R. A. 1994. River pollution. En: Calow P., Petts G. E. (Eds.) *The Rivers Handbook. Volume 2*. Blackwell Science Ltd., 23–32 pp.
- Taub F. B. 1997. Unique information contributed by multispecies systems: Examples from the standardized aquatic microcosm. *Ecological Applications* 7: 1103–1110.
- Thompson D. G., Wojtaszek B. F., Staznik B., Chartrand D. T., Stephenson G. R. 2004. Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision® herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. *Environmental Contamination and Toxicology* 23: 843–849.
- Thomson W. T. 1993. Agricultural Chemicals. Book II Herbicides. Thomson Publications, Fresno, USA, 310 pp.
- Tierney K. B., Singh C. R., Ross P. S., Kennedy C. J. 2007. Relating olfactory neurotoxicity to altered olfactory-mediated behaviors in rainbow trout exposed to three currently-used pesticides. *Aquatic Toxicology* 81: 55–64.
- Tortensson L. 1985. Behaviour of glyphosate in soils and its degradation. En: Grossbard E., Atkinson D. (Eds.) *The Herbicide Glyphosate*. Butterworths, London, 137–150 pp.
- Trigo E. J., Cap E. J. 2006. Diez años de cultivos transgénicos en la agricultura Argentina. ArgenBio, Buenos Aires, 53 pp.
- Trigo E., Chudnovsky D., Cap E., López A. 2002. Los transgénicos en la agricultura argentina. Libros del Zorzal, Buenos Aires, 193 pp.
- Tsui M. T. K., Chu L. M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52: 1189–1197.

- Tsui M. T. K., Chu L. M. 2004. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 316–323.
- Tsui M. T. K., Wang W. X., Chu L. M. 2005. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup®) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution* 138: 59–68
- U.S. Environmental Protection Agency. 1993. Registration eligibility decision (RED): glyphosate. Office of Pesticide Programs. U.S. Environmental Protection Agency, Special Review and Registration Division, Washington, DC, USA.
- Utermöhl H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Limnologie* 9: 1–38.
- Vadeboncoeur Y., Lodge D. M. 2000. Periphyton production on wood and sediment: substratum-specific response to laboratory and whole-lake nutrient manipulations. *Journal of the North American Benthological Society* 19: 68–81.
- Vadeboncoeur Y., Steinman A. 2002. Periphyton function in lake ecosystems. *The Scientific World* 2: 1449–1468.
- Van den Brink P. J., Crum S. J. H., Gylstra R., Bransen F., Cuppen J. G. M., Brock T. C. M. 2009. Effects of a herbicide–insecticide mixture in freshwater microcosms: risk assessment and ecological effect chain. *Environmental Pollution* 157: 237–249.
- van Wijngaarden R. P. A., Arts G. H. P., Belgers J. D. M., Boonstra H., Roessink I., Schroer A. F. W., Brock T. C. M. 2010. The species sensitivity distribution approach compared to a microcosm study: a case study with the fungicide fluazinam. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 109–122.
- Vavilin D. V., Ducruet J.-M., Matorin D. N., Venediktov P. S., Rubin A. B. 1998. Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 42: 233–239.

- Vendrell E., Gómez de Barreda Ferraz D., Sabater C., Carrasco J. M. 2009. Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82: 538–542.
- Venrick E. L. 1978. How many cells to count? En: Sournia A. (Ed.) *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris, France, 167–180 pp.
- Vera M. S., Lagomarsino L., Sylvester M., Pérez G., Rodríguez P., Mugni H., Sinistro R., Ferraro M., Bonetto C., Zagarese H., Pizarro H. 2010. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19: 710–721.
- Vigil J. G., Ruiz M. M. del C., Anacabe D. O. 2004. Solid herbicidal formulation of N-(phosphonomethyl)glycine and process for its preparation. US Patent Application 2004/0102323 A1.
- Vinebrooke R. D., Leavitt P. R. 1996. Effects of ultraviolet radiation on periphyton in an alpine lake. *Limnology and Oceanography* 41: 1035–1040.
- Vorst P., Baard R. L., Mur L. R., Korthals H. J., van den Ende H. 1994. Effect of growth arrest on carotene accumulation and photosynthesis in *Dunaliella*. *Microbiology* 140: 1411–1417.
- Walsh L. P., McCormick C., Martin C., Stocco D. M. 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environmental Health Perspectives* 108: 769–776.
- Wan M. T., Watts R. G., Moul D. J. 1989. Effects of different dilution water types on the acute toxicity to juvenile Pacific salmonids and rainbow trout of glyphosate and its formulated products. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 43: 378–385.
- Wan M. T., Watts R. G., Moul D. J. 1991. Acute toxicity to juvenile pacific northwest salmonids of Basacid Blue NB755 and its mixture with formulated products of 2,4-D, glyphosate, and triclopyr. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 47: 471–478.
- Wang Y.-S., Jaw C.-G., Chen Y.-L. 1994. Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth. *Water, Air, and Soil Pollution* 74: 397–403.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Weber C. I. 1973. Recent developments in the measurement of the response of plankton and periphyton to changes in their environment. En: Glass F. E. (Ed.) *Proceedings of the 9th International Diatom Symposium*, Ann Arbor Sci. Publi., Ann Arbor, MI, 119–138 pp.
- Weitzel R. L. 1979. Periphyton measurements and applications. En: Weitzel R. L. (Ed.) *Methods and measurements of periphyton communities: a review*. American Society for Testing and Materials, Special Technical Publication (ASTM, STP) 690, 3–33 pp.
- Westerhoff H. V., Tsong T. Y., Chock P. B., Chen Y., Astumian R. D. 1986. How enzymes can capture and transmit free energy from an oscillating electric field. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 4734–4738.
- Wetzel R. G. 1983. Opening remarks. En: Wetzel R. G. (Ed.) *Periphyton of freshwater ecosystems*. Dr. W. Junk Publishers, The Hage, Netherlands, 3–4 pp.
- Wetzel R. G. 2001. *Limnology: Lake and river ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA, 1006 pp.
- Wetzel R. G., Likens G. E. 2000. *Limnological analyses*. Third edition. Springer Science+Business Media, Inc., USA, 429 pp.
- Whitton B. A. 1970. Biology of *Cladophora* in freshwaters. *Water Research* 4: 457–476.
- Whitton B. A. 1975. *River Ecology*. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, California, USA, 725 pp.
- Wiens J. A. 1989. Spatial scaling in ecology. *Functional Ecology* 3: 385–397.
- Wiggins G. B., Mackay R. J., Smith I. M. 1980. Evolutionary and ecological strategies of animals in annual temporary pools. *Archiv für Hydrobiologie Supplement* 58: 97–206.
- Williams W. D. 1985. Biotic adaptations in temporary lentic waters, with special reference to those in semi-arid and arid regions. *Hydrobiologia* 125: 85–110.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wong P. K. 2000. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere* 41: 177–182.
- Wood T. M. 2001. Herbicide use in the management of roadside vegetation, western Oregon, 1999–2000: Effects on the water quality of nearby streams. Water-Resources Investigations Report 01–4065. U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey, Portland, Oregon, USA, 27 pp.
- Woodburn A. T. 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science* 56: 309–312.
- Wynn-Williams D. D. 1992. Direct quantification of microbial propagules and spores. En: Wynn-Williams D. D. (Ed.) *Biotas manual of methods*. Scientific Committee on Antarctic Research, Cambridge, UK, 1–34 pp.
- Yamamoto H. Y., Bassi R. 1996. Carotenoids: localization and function. En: Ort D. R., Yocum C. F. (Eds.) *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Países Bajos, 539–563 pp.
- Zar J. H. 1996. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey, USA, 662 pp.
- Zaranyika M. F., Nyandoro G. M. 1993. Degradation of glyphosate in the aquatic environment: an enzymatic kinetic model that takes into account microbial degradation of both free and colloidal (or sediment) particle adsorbed glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 838–884.

ANEXO

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

EFFECTS OF THE HERBICIDE ROUNDUP ON FRESHWATER MICROBIAL COMMUNITIES: A MESOCOSM STUDY

G. L. PÉREZ,^{1,5} A. TORREMORELL,¹ H. MUGNI,² P. RODRÍGUEZ,³ M. SOLANGE VERA,³ M. DO NASCIMENTO,³
L. ALLENDE,³ J. BUSTINGORRY,¹ R. ESCARAY,¹ M. FERRARO,¹ I. IZAGUIRRE,³ H. PIZARRO,³ C. BONETTO,²
DONALD P. MORRIS,⁴ AND H. ZAGARESE¹

¹Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto Tecnológico de Chascomús (Intech), CONICET, Camino Circunvalación Laguna Km 6, CC 164, 7130, Chascomús, Argentina

²Instituto de Limnología Dr. Ringuelet, Avenida Calchaquí km 23.5, 1888, Florencio Varela, Buenos Aires, Argentina

³Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

⁴Department of Earth and Environmental Sciences, Lehigh University, Bethlehem, Pennsylvania 18015 USA

Abstract. The impact of the widely used herbicide glyphosate has been mainly studied in terrestrial weed control, laboratory bioassays, and field studies focusing on invertebrates, amphibians, and fishes. Despite the importance of phytoplankton and periphyton communities at the base of the aquatic food webs, fewer studies have investigated the effects of glyphosate on freshwater microbial assemblages. We assessed the effect of the commercial formulation Roundup using artificial earthen mesocosms. The herbicide was added at three doses: a control (without Roundup) and two treatments of 6 and 12 mg/L of the active ingredient (glyphosate). Estimates of the dissipation rate (k) were similar in the two treatments (half-lives of 5.77 and 7.37 d, respectively). The only two physicochemical parameters showing statistically significant differences between treatments and controls were the downward vertical spectral attenuation coefficient $k_d(\lambda)$, where λ is wavelength, and total phosphorus concentration (TP). At the end of the experiment, the treated mesocosms showed a significant increase in the ratio $k_d(490\text{ nm})/k_d(550\text{ nm})$ and an eightfold increase in TP. Roundup affected the structure of phytoplankton and periphyton assemblages. Total micro- and nano-phytoplankton decreased in abundance in treated mesocosms. In contrast, the abundance of picocyanobacteria increased by a factor of about 40. Primary production also increased in treated mesocosms (roughly by a factor of two). Similar patterns were observed in the periphytic assemblages, which showed an increased proportion of dead:live individuals and increased abundances of cyanobacteria (about 4.5-fold). Interestingly, the observed changes in the microbial assemblages were captured by the analysis of the pigment composition of the phytoplankton, the phytoplankton absorption spectra, and the analysis of the optical properties of the water. The observed changes in the structure of the microbial assemblages are more consistent with a direct toxicological effect of glyphosate rather than an indirect effect mediated by phosphorus enrichment.

Key words: glyphosate; herbicide; optical properties; periphyton; phytoplankton; pigments; primary production; Roundup; water chemistry; wetlands.

INTRODUCTION

The structure of natural communities, the richness and diversity of species, and the interactions among them have profound implications for ecosystem functioning, modulating the fluxes of energy and materials within and among environments (Pratt et al. 1997). Human activities have directly or indirectly added novel stressors to natural aquatic ecosystems, (i.e., climate change, eutrophication, chemical contamination), which have the potential for affecting the structure and function of natural communities. Among these stressors,

herbicides and insecticides have been reported to cause dramatic changes in freshwater environments (e.g., Gustavson et al. 2003, Relyea 2005a, b, Rohr and Crumrine 2005).

Given our incipient and fragmentary understanding of the effects that pesticides have on natural communities (Pratt et al. 1997, Rohr and Crumrine 2005), our ability to accurately forecast the consequences of their use is rather limited. This state of affairs is aggravated in freshwater ecosystems as many pesticides accumulate and concentrate in water bodies (Streit 1992). Since the mid-1990s, the global production of genetically modified herbicides-resistant crops has increased steadily (James 2003). Unfortunately, our understanding and ability to predict future impacts of this new technology have not kept pace with the tremendous expansion of arable land dedicated to these new cultures.

Manuscript received 23 March 2007; accepted 5 April 2007; final version received 3 May 2007. Corresponding Editor: R. A. Relyea.

⁵ E-mail: gperez@intech.gov.ar

In Argentina, over 13 million ha of arable land are dedicated to the production of transgenic, glyphosate-resistant (GR) soy and, together with Canada and the United States, contributes to most of the global acreage cultured with GR crops. Presently, Argentina is the second largest world producer of GR soy (30 Mg/yr). This production has been accompanied by an increase in the use of glyphosate (over 60 million L between 1998 and 1999) applied at a rate of up to 10 L/ha (Lapitz et al. 2004). Thus, the substitution of traditional crops by GR soy within the last couple of decades represents a large-scale, unplanned, ecological experiment, whose consequences for natural ecosystems, and aquatic environments in particular, are poorly understood.

Here, we report the results of an outdoor study performed in earthen experimental mesocosms, aimed at identifying the potential effects of Roundup on natural freshwater assemblages. Mesocosms are valuable tools that complement conventional toxicity tests by bringing experimentation one step closer to nature (SETAC-RESOLVE 1992). In this study, we have measured the loss rate of glyphosate from the experimental units and recorded Roundup effects on a large number of physicochemical and biological parameters (focused on phytoplankton and periphyton assemblages).

Glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] is a broad spectrum, post-emergent herbicide widely used in agriculture and silviculture for the control of grasses, sedges and broad-leaved weeds (Goldsborough and Brown 1988). The commercial formulation Roundup contains 480 g/L of glyphosate, as the isopropylamine salt. Glyphosate's primary mode of action in plants and several microorganisms is the disruption of aromatic amino acid biosynthesis (Duke et al. 2003), through the inhibition of the enzyme 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphate (EPSP), which halts the production of chorismate. The process ultimately results in the reduction of aromatic amino acids, which in turn reduces or halts protein synthesis, causing cessation of growth and eventually cellular disruption and death. In addition to its main mode of action, glyphosate is known to impair a number of cellular structures and other biochemical processes, such as disruption of chloroplasts, membranes and cell walls, and the alteration of nucleic acid synthesis, photosynthesis, and respiration (e.g., Campbell et al. 1976, Ali and Fletcher 1978, Hernando et al. 1989, Schaffer and Sebetich 2004).

Under field conditions, glyphosate is usually assumed to be rapidly and tightly adsorbed to soil particulates. Consequently, it is generally thought to have negligible off-target mobility from soils to ground or surface waters (Roy et al. 1989, Duke et al. 2003). Nevertheless, off-target displacements of glyphosate have been reported by several authors. Glyphosate may reach aquatic systems either by accidental or wind driven drift of the herbicide spray, or by surface runoff of suspended particulate matter (Bowmer 1982, Goldsborough and

Beck 1989, Feng et al. 1990, U.S. Environmental Protection Agency 1993). Adsorption of glyphosate to soil particulates is determined by chemical and physical characteristic of soils, which in turn affect the potential for off-target movement of the herbicide through water runoff or subsurface flow. Interestingly, given that glyphosate is bound to soil through its phosphonic acid moiety, the addition of inorganic phosphorus could potentially release glyphosate from soil particles (Franz et al. 1997, Pechlaner 2002) through competition for sorption sites. In Argentina, the use of fertilizers has increased about 10 times in the last decade in relation with the agricultural development (Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias 2003, Lapitz et al. 2004), increasing the likelihood of transporting glyphosate to aquatic ecosystems.

Once in the aquatic environment, glyphosate may become toxic to living organisms, including plants, animals, and microorganisms. Although glyphosate has been widely used and studied in terrestrial weed control, comparatively fewer studies have assessed its effects on natural aquatic biota (Austin et al. 1991, Pechlaner 2002). Among the latter, most studies have used laboratory bioassays to assess the effects of glyphosate on aquatic organisms (e.g., Hartman and Martin 1985, Gardner et al. 1997, Relyea 2004, Schaffer and Sebetich 2004). Field studies, on the other hand, have mostly focused on fish, especially salmonids (Mitchell et al. 1987, Servizi et al. 1987, Wan et al. 1989), invertebrates (Folmar et al. 1979, Kreutzweiser et al. 1989), and amphibians (e.g., Relyea 2005a, b, Relyea et al. 2005). Despite the importance of phytoplankton and periphyton communities at the base of the aquatic food webs, fewer studies have investigated the effects of glyphosate on freshwater microbial communities (Pechlaner 2002).

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

An experiment was carried out in 10 artificial earthen ponds (i.e., mesocosms) that were 1.2 m deep and had a surface area of 25 m². We assayed three concentrations of the herbicide Roundup: control (without Roundup, four replicates), low dose (nominal glyphosate concentration 6 mg active ingredient/L, three replicates), and high dose (nominal glyphosate concentration 12 mg active ingredient/L, three replicates). These nominal concentrations were chosen to be comparable to the concentrations assayed by other authors (Goldsborough and Brown 1988, Schaffer and Sebetich 2004, Relyea 2005a). The assayed concentrations were slightly higher than those recommended for aquatic and terrestrial weed control (3.7 mg active ingredient/L [Giesy et al. 2000]), or those measured in natural environments (up to 2.6 mg active ingredient/L [Newton et al. 1984, Goldsborough and Brown 1989, Feng et al. 1990, Thompson et al. 2004]). Thus, the assayed concentrations represent a worst-case scenario. As far as we know,

there is no information of measured glyphosate concentrations in standing natural waters of Argentina.

Water samples were collected from each mesocosm on four occasions using a Van Dorn-style bottle. The first samples were collected either immediately before application (for most variables) or immediately after application (for glyphosate determination). The remaining samples were collected at 1, 6, and 11 days after herbicide application. The samples were poured into 5-L plastic containers from which subsamples were taken for glyphosate determinations and analyses of physical, chemical, and biological variables. The study of the periphyton assemblage was performed using artificial substrates, which were placed in each mesocosm 25 days before the beginning of the experiment to allow for substantial colonization.

Glyphosate residual analysis

Analyses of glyphosate were carried out on water samples filtered through 0.45- μm membrane filter. The analyses were performed by reversed-phase HPLC (high performance liquid chromatography) following derivatization with fluorenylmethyl chloroformate chloride (FMOC chloride), following Miles et al. (1986).

Optical properties

Vertical profiles of ultraviolet (UV) and photosynthetically active radiation (PAR, 400–700 nm) downward irradiance were obtained with a submersible profiling radiometer (Eldonet, Erlangen, Germany). In addition, spectral information was collected using a spectral radiometer (USB2000; Ocean Optics, Dunedin, Florida, USA). Monochromatic and broadband (PAR) attenuation coefficients $k_d(\lambda)$ and $k_d(\text{PAR})$ were calculated by regressing log-transformed irradiance measurements against depth.

The light absorption spectra by total particles [$a_p(\lambda)$] were determined after concentration of the particles on GF/F filters following the filter pad technique (Trüper and Yentsch 1967). The path length amplification factor (β factor) was determined according to Mitchell and Kiefer (1988) and Bricaud and Stramski (1990). After measuring the absorption of total particulate matter, the spectral absorption of non-algal material [$a_d(\lambda)$] was measured separately following Kishino et al. (1984). The absorption coefficients of viable phytoplankton [$a_{ph}(\lambda)$] were obtained by subtracting the bleached matter absorption [$a_d(\lambda)$] from the absorption by total particulate matter [$a_p(\lambda)$].

The spectral absorption by chromophoric dissolved organic matter (CDOM) was measured on 0.2- μm filtered water in quartz cuvettes (0.01 m path length) against a distilled water blank. The absorption coefficients due to CDOM [$a_g(\lambda)$] were calculated following Kirk (1994). Optical densities were measured using a Hitachi U-2000 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan) in the spectral range of 400–750 nm at 1-nm intervals.

Chemical analysis

Given that glyphosate dissipation kinetics in natural waters is likely to be site specific, due to the variety of chemical, physical, and biological variables, the physical and chemical properties of the mesocosms' water were characterized as fully as possible. Water for chemical analysis was filtered immediately after sampling through Whatman GF/C filters. Soluble reactive phosphorus (SRP) was measured by the molybdate-ascorbic method, NO_3^- and NO_2^- by Cd reduction followed by diazotization and NH_4^+ by the indophenol blue method, following the American Publication Health Association (1998). Ca^{2+} and Mg^{2+} (atomic absorption spectrometry), Na^+ and K^+ (flame photometry), HCO_3^{3-} (titration), SO_4^{2-} (turbidimetry), and Cl^- (AgNO_3 titration) were determined following the American Publication Health Association (1998). Suspended matter was determined as the mass difference after filtration through the Whatman GF/C filters. The filters were pre-combusted to 550°C for 2 hours prior to use.

Aliquots of filtered water were stored at 4°C until analysis of DOC (dissolved organic carbon). DOC was measured by a high temperature Pt catalyst oxidation method (Shimadzu TOC-5000; Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, South Carolina, USA). Prior to measurement, samples were sonicated and acidified (with HCl).

Enumeration of phytoplanktonic organisms

The different size fractions of the phytoplankton and bacterioplankton were quantified. Micro- (>20 μm) and nanophytoplankton (2–20 μm) samples were fixed with 1% acidified Lugol's iodine solution. Picophytoplankton (0.2–2 μm) and bacterioplankton samples were preserved with 2% ice-cold glutaraldehyde. Counts of micro- and nanophytoplankton were performed using the inverted microscope technique (Utermöhl 1958) at 400 \times magnification. The counting error (<15%) was estimated according to Venrick (1978). Algal biovolumes were calculated according to Sun and Liu (2003). The picophytoplankton fraction was counted by taking advantage of the autofluorescence of photosynthetic pigments (Caron 1983, Hawley and Whitton 1991). Samples were collected on 0.2- μm black polycarbonate filters (Isopore GTPB 02500; Isopore, Billerica, Massachusetts, USA) then mounted on a microscope slide with a drop of immersion oil (Immersion Oil Zeiss 518 F; Zeiss, Jena Germany). Each filter was examined for pigment autofluorescence with a Zeiss Axioplan microscope equipped with an HBO 50-W lamp and a filter set for blue light excitation (BP 450–490 nm, FT 510 nm, LP 520 nm) and green light excitation (BP 546 nm, FT 580 nm, LP 590 nm) (Wynn-Williams 1992, Rankin et al. 1997). Bacterioplankton were concentrated and counted on polycarbonate filters (as above), which were stained with DAPI (Porter and Feig 1980). Bacteria were counted using an epifluorescence microscope with UV excitation (BP 365 nm, FT 395 nm, LP 397 nm). For

estimates of both picophytoplankton and bacterioplankton abundance, a minimum of 20 fields and 400 individuals were counted on each slide (error <15%).

Primary production of phytoplankton

Phytoplankton primary production (PP) was measured by the ^{14}C -technique (Steeman-Nielsen 1952). Samples were incubated for 3 h in 45-mL quartz tubes placed at the surface of an outdoor water bath. For each mesocosm, two samples were incubated at saturating, but not photoinhibiting, irradiance levels using neutral density filters in combination with a long-pass cut-off filter at 395 nm to remove the UV component of sunlight. Irradiance levels were decided based on preliminary production vs. irradiance curves. In addition, a single tube per mesocosm was wrapped with aluminum foil and used as an estimate of dark ^{14}C assimilation. One μCi of ^{14}C -labeled NaHCO_3 was added to each tube. After incubation, samples were filtered through GF/F filters, placed in an HCl saturated atmosphere, and dried overnight. The activity of filters was measured in a scintillation counter with 2.5 mL of OptiPhase HiSafe3 scintillation solution (OptiPhase, Van Nuys, California, USA). Dark ^{14}C assimilation was subtracted from PP estimates.

HPLC measurements and pigment analysis

Photosynthetic and photoprotecting pigments were estimated from triplicate samples (110–250 mL) collected onto Whatman GF/F filters. Filters were immediately wrapped in aluminum foil and stored at -80°C until processing (within two months of sampling). Pigments were extracted (overnight, at 4°C , in the dark on a nitrogen-saturated atmosphere) using 90% (by volume) aqueous acetone and the extracts were cleared by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. Pigment extracts were measured by ion pairing reverse-phase HPLC (modified from Mantoura and Llewellyn [1983] and Hurley [1988]) using a Äktabasic chromatograph (Amersham, Buckinghamshire, UK) controlled by the program Unicorn (Amersham, Buckinghamshire, UK). The method employed was described in Laurion et al. (2002). The HPLC system was calibrated with commercially available primary standards provided by the International Agency for ^{14}C Determination or from Sigma (Buchs, Switzerland).

Periphyton assemblage

Artificial substrates (clear polycarbonate strips of known surface) were suspended at approximately 10 cm below water surface in each mesocosm. On each sampling date, the periphyton on the substrate was removed by means of a fine brush and divided into aliquots for the different analyses. For the analysis of the periphyton composition the following parameters were considered: algae identification (samples were resuspended and treated as described for phytoplankton), ratio of dead:live algae, chlorophyll *a* concentra-

tion (by reverse-phase HPLC method, as described above), dry mass (DM), and ash-free dry mass (AFDM). Both DM and AFDM are expressed on an areal basis (American Publication Health Association 1998). In addition, the autotrophic index was estimated as the ratio of AFDM:chlorophyll *a*. An AI value higher than 200 indicates high proportion of heterotrophic, non-chlorophyllous organisms or organic detritus (American Publication Health Association 1998, Lowe and Pan 1996).

Statistical analysis

Prior to each analysis, Kolmogorov-Smirnov tests (with Lilliefors' correction) and Levene median tests were run in order to test data for normality and homoscedasticity. Whenever the data did not conform, the values were transformed (square-root, arcsine square-root, or log) as necessary. For all variables, differences among treatments were assayed using repeated-measures analysis of variance (RM ANOVA), with three treatments (control, low dose, and high dose of glyphosate) and four sampling times (0, 1, 6, and 11 d). RM ANOVA analyses were followed by all pairwise multiple comparisons (post hoc testing), using the Holm-Sidak method ($P < 0.05$).

RESULTS

Glyphosate dissipation

The glyphosate concentrations shortly (1 h) after the herbicide application were 12.65 ± 2.85 mg/L (mean \pm SD) in the high-dose treatment, 5.45 ± 1.01 mg/L in the low-dose treatment, and below our detection limit (<0.5 mg/L) in the controls. Assuming first-order kinetics, the estimated dissipation rate constants (k) were similar in the two treatments: $k = 0.094 \pm 0.017$ d^{-1} for low dose and $k = 0.120 \pm 0.027$ d^{-1} for high dose; with half-lives of 5.77 and 7.37 d, respectively (Fig. 1). No significant differences in glyphosate dissipation were observed between doses (paired *t* test, $P = 0.151$).

Physical and chemical characteristics of the mesocosms' water

The initial ionic concentrations in the mesocosms were in general uniform among experimental units. The water for all mesocosms was chemically concentrated (specific conductivity 2.8 ± 0.1 mS/cm at 21°C) and alkaline (7750.3 ± 454.1 mg CaCO_3/L). Ionic composition were characterized by a high concentration of Na^+ (811.6 ± 37.5 mg/L), and Cl^- (470.7 ± 8.4 mg/L) and HCO_3^- (465.5 ± 39.9 mg/L). Initial mean water temperature and pH were $17.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and 9.3 ± 0.2 , respectively. Nutrient concentrations showed high values typical of meso-eutrophic conditions. Mean values of TP and N-NH_4^+ were 78.9 ± 1.8 $\mu\text{g}/\text{L}$ and 8.9 ± 1.6 $\mu\text{g}/\text{L}$, respectively.

During the experiment, water temperature ranged between 17.3° and 21.8°C , pH ranged between 8.5 and 10.0, and dissolved oxygen ranged between 5.8 and 15

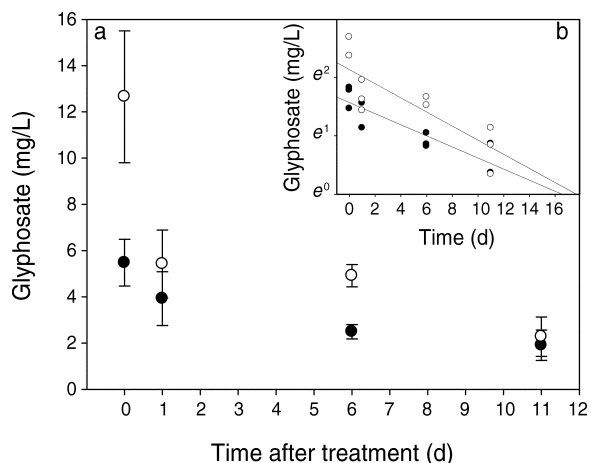


FIG. 1. (a) Dissipation of glyphosate (active ingredient in the herbicide Roundup) from mesocosms' water. Open circles are low doses, and solid circles are high doses. (b) Glyphosate residue fitted to a logarithmic function assuming first-order kinetics. Error bars represent \pm SD.

mg/L. Conductance averaged 2.8 ± 0.2 mS/cm (mean \pm SD), with Na^+ as the dominant cation (>97% of all cations combined) and Cl^- and HCO_3^- as the dominant anions (85% of all anions). In general, the ionic chemistry did not vary significantly among treatments (RM ANOVA, $P > 0.05$) although significant differences were observed between dates (Table 1).

The concentration of most nutrients (N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , and SRP) varied over time, but did not display significant differences among treatments. The important exception being the concentration of total phosphorus (TP), which showed a remarkable increase after the addition of glyphosate to the treated mesocosms. More specifically, significant differences were observed among time and among treatments, as well as the treatment-by-time interaction (Table 1). Values of TP ranged from 58 to 879 $\mu\text{g/L}$ with a mean value of 287 $\mu\text{g/L}$. Holm-Sidak multiple comparison method showed that the mesocosms treated with both doses of Roundup presented a significant increase in TP concentration

from day 0 to day 11 (RM ANOVA, $P < 0.005$), and that this pattern was not observed in control mesocosms.

Dissolved organic carbon (DOC) and particulate organic carbon (POC) concentrations ranged from 3.19 to 12.41 mg/L and from 0.3 to 4.1 mg/L, respectively. Total suspended solids (TSS) ranged from 2.6 to 50.4 mg/L. No significant differences among treatments or among times were observed for these variables (RM ANOVA, $P > 0.05$). (A summary of the physicochemical characteristics of the mesocosms are provided in the Appendix.)

In general, the inherent optical properties (absorption coefficients of particulate and dissolved substances) and the apparent optical properties (PAR vertical attenuation coefficients [Fig. 2a], UVA vertical attenuation coefficients, and turbidity) did not display systematic differences between treatments or dates (RM ANOVA, $P > 0.05$). However, statistically significant differences in the ratio $k_d(490 \text{ nm})/k_d(550 \text{ nm})$ were observed between times and treatments (Table 1). Mean comparisons revealed that at the end of the experiment significant differences were observed in the ratio $k_d(490 \text{ nm})/k_d(550 \text{ nm})$ between high-dose and control treatments (RM ANOVA, $P < 0.005$), indicating an increase in the attenuation of greenish-blue light as compared to the green wavelengths (Fig. 2c). Such spectral differences in $k_d(\lambda)$ were not observed before glyphosate addition (Fig. 2b; RM ANOVA, $P > 0.05$).

In addition, we found a significant positive linear relationship between $k_d(490 \text{ nm})/k_d(550 \text{ nm})$ and $a_{\text{ph}}(490 \text{ nm})/a_{\text{ph}}(550 \text{ nm})$ ($r^2 = 0.71$, $P = 0.004$, $n = 10$; $k_d(490 \text{ nm})/k_d(550 \text{ nm}) = 5.17[a_{\text{ph}}(490 \text{ nm})/a_{\text{ph}}(550 \text{ nm})] - 1.28$) by the end of the experiment, strongly suggesting that the attenuation at these wavelengths was mostly controlled by the in vivo absorption of phytoplankton.

Effect of Roundup on phytoplankton and periphyton communities

Phytoplankton abundance ranged from 30×10^3 to 140×10^3 individuals/mL (Fig. 3a). Significant differences in micro- and nanophytoplankton abundances

TABLE 1. Summary of the RM ANOVAs for variables that displayed significant differences ($P < 0.05$) due to treatment or the treatment-by-time interaction.

Effect	Time			Treatment			Treatment \times time		
	df	F	P	df	F	P	df	F	P
TP	3, 18	262.324	<0.001	2, 7	50.658	<0.001	6, 18	29.145	<0.001
$K_d(490)/k_d(550)$	1, 6	6.457	0.044	2, 6	8.714	0.017	2, 6	3.592	0.094
Phytoplankton abundance	3, 18	3.016	0.057	2, 6	6.788	0.029	6, 18	9.853	<0.001
Phytoplankton abundance (as % of initial values, % d 0)	2, 12	9.796	0.003	2, 6	20.602	0.002	4, 12	4.876	0.014
Picy abundance	3, 18	8.187	0.001	2, 6	1.739	0.254	6, 18	3.689	0.014
Periphyton abundance (living/dead)	3, 21	12.198	<0.001	2, 7	0.172	0.846	6, 21	5.510	0.001
Periphyton abundance (living/dead) (as % of initial values, % d 0)	2, 14	5.281	0.020	2, 7	8.469	0.020	4, 14	1.410	0.281
Primary productivity	3, 18	5.915	0.005	2, 6	1.919	0.227	6, 18	3.265	0.024
(Zeaxanthin + lutein)/chl <i>a</i>	3, 21	22.240	<0.001	2, 7	3.527	0.087	6, 21	4.327	0.005

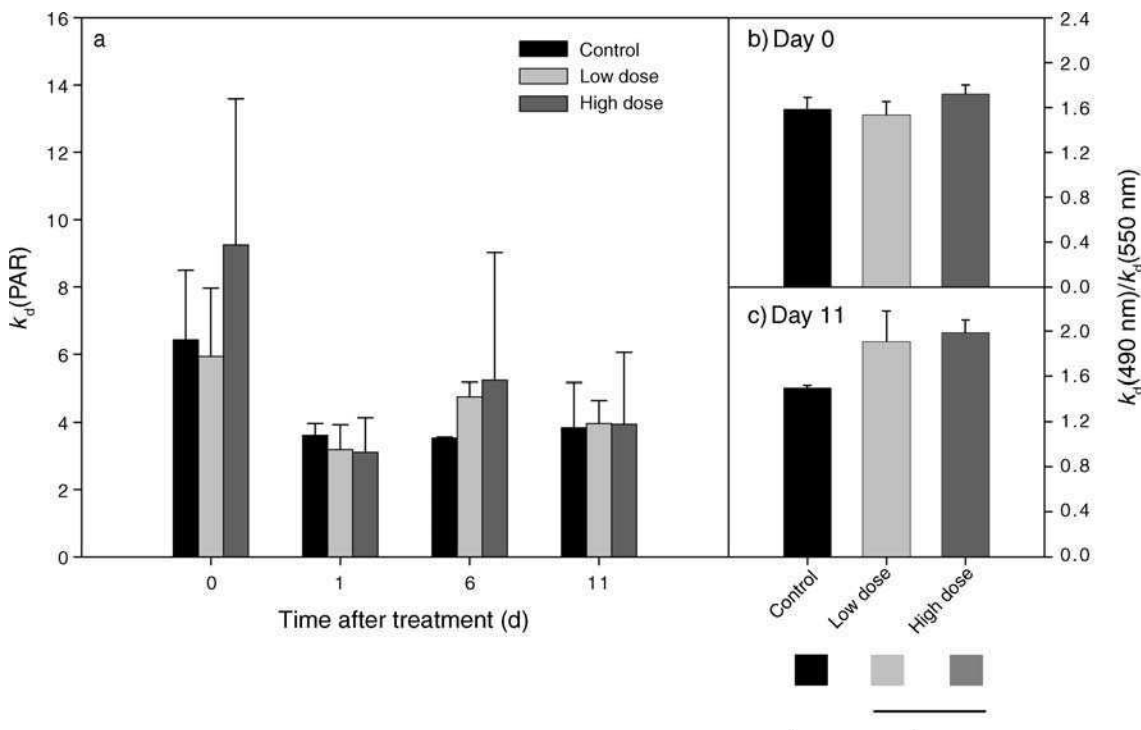


FIG. 2. Downward diffuse attenuation coefficients under control conditions (no Roundup), and at low (6 mg/L) and high (12 mg/L) doses of glyphosate: (a) $k_d(\text{PAR})$; (b) ratio $k_d(490 \text{ nm})/k_d(550 \text{ nm})$ on day 0; (c) ratio $k_d(490 \text{ nm})/k_d(550 \text{ nm})$ on day 11. Statistically significant differences ($P < 0.05$) for day 11 are indicated by the gray scale below panel (c); treatments connected by the same line are not significantly different. Terms: k_d , vertical spectral attenuation coefficient (λ), under photosynthetically active radiation (PAR) and expressed as a ratio at 490 nm and 550 nm. Error bars represent 1 SD.

(>3 μm) were observed among treatments. The interaction between treatments and time was also significant (Table 1). Mean comparisons revealed that the abundance of micro- and nanophytoplankton decreased significantly over time in mesocosms treated with Roundup but not in the controls (Fig. 3a). Due to within-treatment variability, the above differences can be better appreciated by expressing the abundance of phytoplankton as a percentage of the initial values for each mesocosm (Fig. 3b). The micro- and nanophytoplankton abundances standardized to initial values displayed significant differences due to treatments, time, and the treatment-by-time interaction (Table 1). By the end of the experiment, mesocosms treated with both doses of Roundup showed a 2.5-fold decrease in micro- and nanophytoplankton mean abundances (Fig. 3b). No significant differences were observed between treatments when the amount of phytoplankton was expressed as biovolume (RM ANOVA, $P > 0.05$).

Interestingly, the opposite pattern was displayed by one group of autotrophic picoplankton algae, namely the picocyanobacteria (picy). Picy abundance ranged from 6.02×10^3 to 7.80×10^6 cells/mL, and significant differences were observed due to time and the time-by-treatment interaction (Table 1). Mean comparisons showed that picy abundance significantly increased after the addition of the Roundup at either dose (RM

ANOVA, $P < 0.005$), but not in controls (Fig. 3c). By the end of the experiment, mean Picy abundance had increased roughly 40 times in the high-dose treatment as compared to the initial values (RM ANOVA, $P < 0.005$; Fig. 3c). On the other hand, the abundance of the remaining picoplanktonic organisms (heterotrophic bacteria and picoplanktonic eukaryotes) did not exhibit significant differences between treatments (RM ANOVA, $P > 0.05$). Mean abundances were $2.12 \times 10^5 \pm 1.75 \times 10^5$ cells/mL for heterotrophic bacteria and $2.65 \times 10^3 \pm 3.35 \times 10^3$ cells/mL for picoplanktonic eukaryotes.

The phytoplankton primary production averaged $0.204 \pm 0.182 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, and ranged from 0.03 to $1.02 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. PP did not show significant differences among treatments, but the differences due to the interaction between treatment and time were significant (Table 1, Fig. 3d). Mean comparisons showed that the mesocosms treated with higher dose experienced a twofold increase in PP from day 0 to day 11 (RM ANOVA, $P < 0.005$). A similar, but nonsignificant, trend was observed in the lower dose treatment (RM ANOVA, $P > 0.05$). This pattern was not observed in control mesocosms (RM ANOVA, $P > 0.05$).

Regarding the periphyton assemblage, the values of chlorophyll *a* and AFDM averaged $4.98 \pm 4.67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $2963 \pm 2929 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. No significant

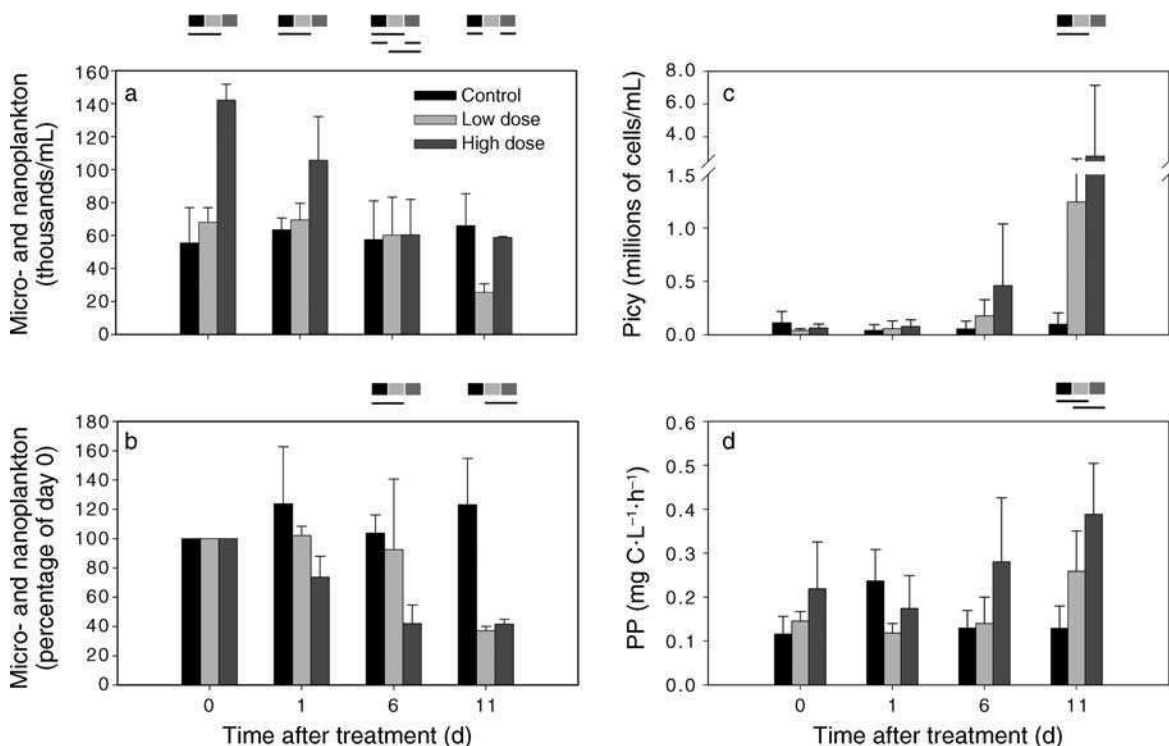


FIG. 3. (a) Total micro- and nanophytoplankton abundance; (b) algal abundance standardized to initial values on day 0; (c) picocyanobacteria (picy) abundance (notice the break in the y-axis); and (d) phytoplankton primary production (PP). Statistically significant differences ($P < 0.05$) are indicated by the gray scale above the panels; treatments connected by the same line are not significantly different. Error bars represent 1 SD.

differences among treatment were detected for these estimates of biomass. The periphyton assemblage was dominated by Bacillariophyceae (77%), followed by Cyanobacteria (21.2%) and Chlorophyceae (0.6%). The variability in total periphyton algal abundance (dead + live organisms: 484 878 and 5 861 686 individuals/cm²) could not be related to treatments and dates. However, the proportion living/dead organisms showed significant differences among time and in the treatment-by-time interaction (Table 1). The living/dead proportion was also expressed as percentage of the initial values to account for the initial differences among replicates (Fig. 4a). By doing so, differences among time and among treatments could be observed (Table 1). Mean comparisons showed that living/dead proportion (as a percentage of initial values) showed significant differences between control and treated mesocosms for both doses (RM ANOVA, $P < 0.005$). By the end of the experiment, the proportion of total living individuals in the mesocosms treated with the Roundup was about one-third of that observed in the control mesocosms, and the proportion was even smaller (approximately one-fifth) for the Bacillariophyceae. Paralleling the trends observed in the phytoplankton assemblage, the periphytic cyanobacteria (particularly *Cyanothece* spp.) appeared to increase after the addition of the herbicide (Fig. 4b), but in this case, the differences among

treatments were not statistically significant. Similarly, the autotrophic index (AI), tended to increase in the treated mesocosms, but again in this case the differences between treatments were not significant (Fig. 4c).

Effect of Roundup on phytoplanktonic pigment composition

Overall, we were able to detect the presence of the following pigments: chl *a*, chl *b*, chl *c*₁ + *c*₂ (which could not be distinguished by our method), neoxanthin, fucoxanthin, diadinoxanthin, astaxanthin, alloxanthin, mixoxanthophyll, zeaxanthin + lutein (which could not be distinguished by our method), echinenone, and β -carotene. The variations in pigment concentration standardized to chl *a* are summarized in Fig. 5. The concentrations of some pigments were significantly affected by the addition of Roundup. An increase in zeaxanthin + lutein relative to chl *a* was observed in the treated mesocosms (Fig. 5e). Although RM ANOVA analysis did not show significant differences between treatment, the treatment-by-time interaction was significant ($P < 0.001$; Table 1), and by the end of the experiment the concentration of zeaxanthin + lutein in the treated mesocosms was significantly higher than the initial values (RM ANOVA, $P < 0.005$). Such a pattern was not observed in the controls (RM ANOVA, $P > 0.05$). A significant linear relationship was obtained

between zeaxanthin + lutein and picy abundance ($r^2 = 0.51$, $P = 0.001$, $n = 32$; $\log[\text{picy}] = 1.02 \log[\text{zeaxanthin} + \text{lutein}] + 4.37$; Fig. 6a). In addition, a significant linear relationship was obtained between $a_{\text{ph}}(490 \text{ nm})/a_{\text{ph}}(550 \text{ nm})$ and picy abundance ($r^2 = 0.43$, $P = 0.001$, $n = 33$; $\log[\text{picy}] = 0.27 [a_{\text{ph}}(490 \text{ nm})/a_{\text{ph}}(550 \text{ nm})] + 3.98$; Fig. 6b), as well as between $k_d(490 \text{ nm})/k_d(550 \text{ nm})$ and zeaxanthin + lutein ($r^2 = 0.70$, $P = 0.002$, $n = 10$; $\log[\text{zeaxanthin} + \text{lutein}] = 2.01[k_d(490 \text{ nm})/k_d(550 \text{ nm})] - 2.74$; Fig. 6c).

DISCUSSION

Glyphosate half-lives ($\sim 6\text{--}7$ d) was longer than most values reported in the literature (half-lives < 4 d) for streams (Newton et al. 1984, Feng et al. 1990) and ponds (Goldsborough and Beck 1989). To our knowledge, only one study had reported higher glyphosate half-lives (11.2 d) in water of boreal forest ponds (Goldsborough and Brown 1993). Laboratory and field studies suggested that the main mechanism of glyphosate removal from water is adsorption to suspended particulates followed by subsequent sedimentation and/or biodegradation (Goldsborough and Beck 1989, Feng et al. 1990, Zaranyika and Nyandoro 1993). Adsorption of glyphosate increases with the amount of suspended solids, decreases with soil pH, inorganic phosphorus content, and cation concentration, and is poorly correlated with textural parameters (Sprinkle et al. 1975a, b, Hance 1976, Nomura and Hilton 1977, Rueppel et al. 1977, Glass 1987, Goldsborough and Beck 1989). The relatively long half-life obtained in this study may be partly related to the high cation concentrations prevailing in our mesocosms. The physicochemical conditions observed in our mesocosms were similar to those reported for shallow lakes in the surrounding area (Izaguirre and Vinocur 1994), whose waters are alkaline, dominated by sodium-bicarbonate, and characterized by high trophic degree (Ringuelet et al. 1968, Ringuelet 1972).

The duration of our experiment was decided a priori on the basis of published decay rates of glyphosate, which indicated that the glyphosate concentration would drop below detection limits within 10 d. However due to the longer half life, observed in our experiment, measurable concentrations of glyphosate were present by the end of our study. The assayed concentrations of Roundup significantly affected the structure and functioning of our experimental systems. A major change in water chemistry was the significant increase in total phosphorus concentration. The commercial formulation, Roundup, contains glyphosate, water, and POEA (Folmar et al. 1979, Relyea 2005a, b). POEA is a complex mixture of fat from fatty tissues of cattle or sheep, whose precise formulation is kept as a secret by Monsanto, but which is not supposed to contain phosphorus. On the other hand, phosphorus contributes 14% to the molecular weight of glyphosate. Thus, the nominal concentrations of glyphosate applied to our

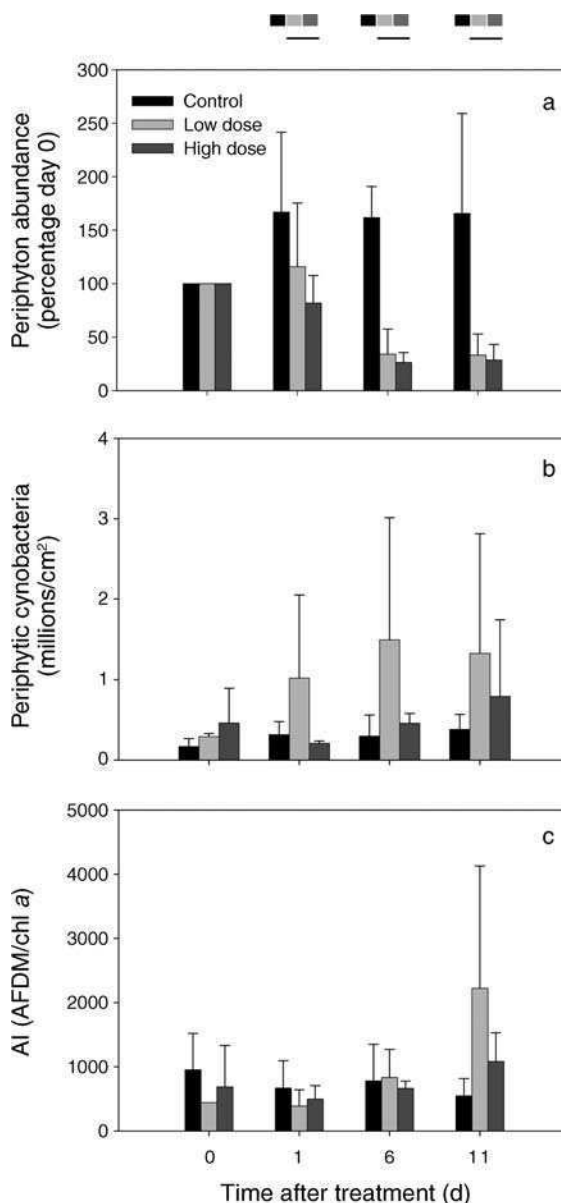


FIG. 4. (a) Ratio of living/dead periphyton as percentage of initial values on day 0; (b) total periphytic cyanobacteria abundance; and (c) autotrophic index (AI), the ratio of ash-free dry mass of autotrophs to chlorophyll *a*. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated by the gray scale code above the graph; treatments connected by the same line are not significantly different.

mesocosms, 6 and 12 mg/L, contributed 840 and 1680 $\mu\text{g/L}$ of phosphorus. These concentrations are higher than those actually measured immediately after the addition of Roundup. For the remaining sampling dates, the amount of TP measured in our mesocosms was always similar or lower than the amount predicted by the sum of the initial TP concentration plus the phosphorus supplied by the measured concentrations of glyphosate. In other words, the measured amounts of

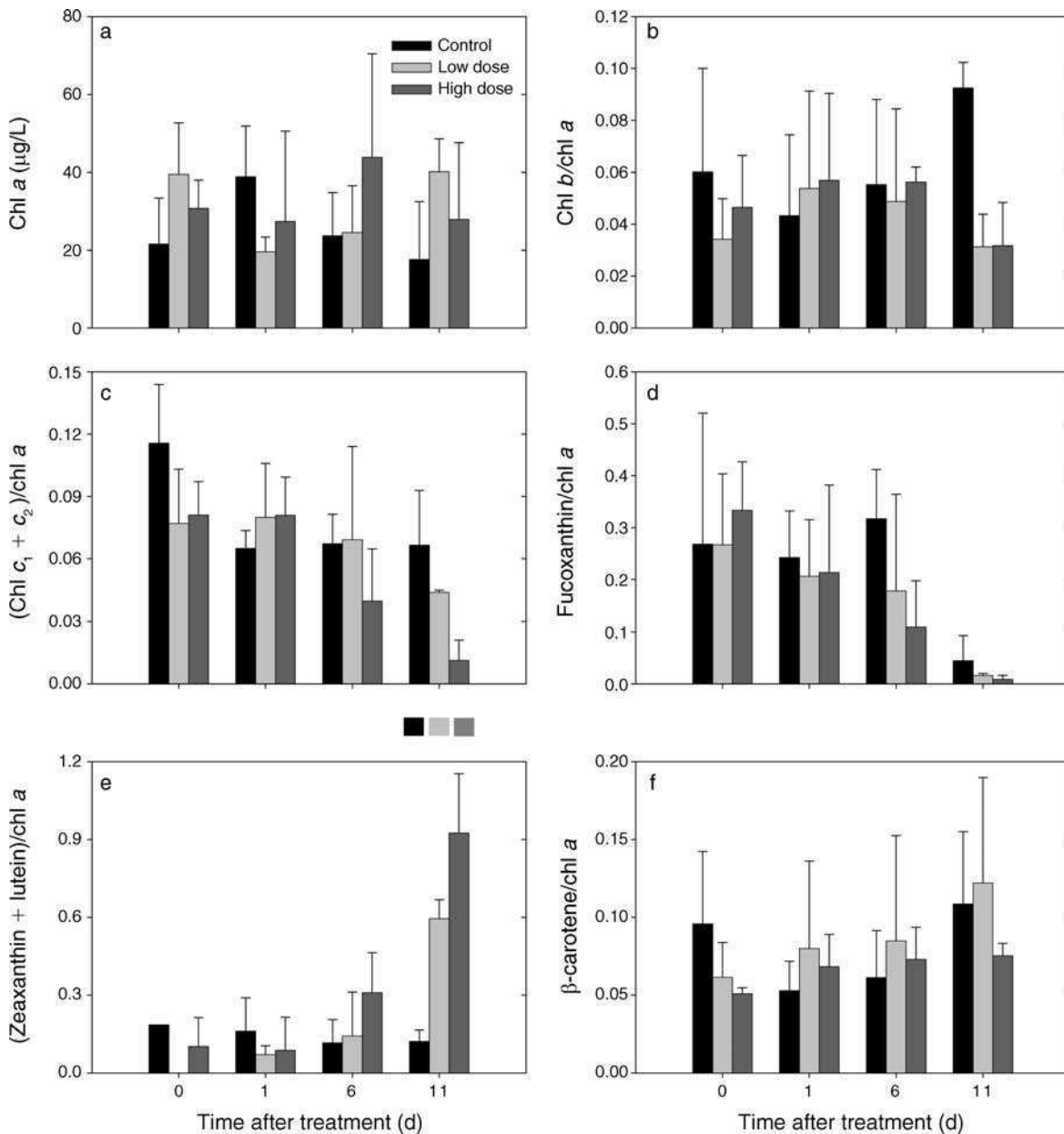


FIG. 5. Main algal accessory pigment concentrations relative to chlorophyll *a*. Coding of significant differences is as in Fig. 4.

glyphosate always sufficed to explain the increase in TP observed in the treated mesocosms.

Phosphorus is one of the key factors influencing algal assemblages, thus the observed changes in phytoplankton and periphyton composition could have been mediated by an indirect effect (i.e., the increase in TP), rather than by the direct toxicological effect of Roundup. However two pieces of evidence are contrary to the first alternative, and indirectly provide support for the toxicological interpretation. First as mentioned above, the excess of TP may be completely explained by the presence of glyphosate in solution, and as such unavailable for algae growth, at least by the time of

sample collection. Second, several studies have shown that large algae benefit more than small algae upon phosphorus enrichment (Stockner 1988, Masson et al. 2000). In contrast, we observed a decrease in the abundance of the largest fractions and a marked increase of picoplankton abundance in response to glyphosate addition. Interestingly, the observed changes in phytoplankton assemblage fractions did not translate into significant changes of biovolume or chl *a*.

On the other hand, many of the effects observed in our study are consistent with previous works using glyphosate formulations without additives. For instance, the observed negative effect on several large size

phytoplankton species is consistent with the results from single species toxicity tests (e.g., Gresshoff 1979, Sáenz et al. 1997) and mesocosm-scale experiments (Kallqvist et al. 1994). In addition, the observed increases in primary production are consistent with the results obtained by Schaffer and Sebetich (2004), which used the commercial product Rodeo, which lacks additives.

There is little available information comparing the effects of glyphosate alone and those of commercial formulations on phytoplankton and periphyton species. Sáenz et al. (1997) found that surfactant increased the toxicity of glyphosate on periphyton assemblages in experiments conducted with both technical grade glyphosate and Ron-do (a product including a different surfactant, i.e., not POEA). Cedergreen and Streibig (2005) reported that Roundup was roughly four times more toxic to the aquatic macrophyte *Lemna minor* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* than glyphosate alone.

One of the most remarkable results of our experiments was the roughly 40-fold increase in Picy abundance. To our knowledge, this is the first report that Roundup stimulates picocyanobacteria in freshwater systems. Cyanobacteria are known to be resistant to glyphosate by either one of two mechanisms: the overproduction of EPSP synthase, or the production of a glyphosate-tolerant enzyme (Powell et al. 1991, 1992).

There is a paucity of investigations on the effect of glyphosate on periphytic communities (Hoagland et al. 1996), and the few studies that have been published used different experimental designs (Goldsborough and Brown 1988, Austin et al. 1991). In our study, the effects of Roundup on periphyton mirrored those observed in the phytoplankton assemblage. Particularly, the proportion of cyanobacteria increased at the expense of diatoms. The trends in both phytoplankton and periphyton support the general perception that cyanobacteria are particularly resistant to extreme environments, including herbicide stressed habitats (Powell et al. 1991, 1992).

The possibility that Roundup could stimulate nuisance algae warns against its indiscriminate use. In particular, the development of cyanobacteria blooms in freshwaters have been recognized as significant events that may adversely affect water quality and impact human and animal health (Carmichael 1994, Bell and Codd 1996).

On a methodological note, the assessment of agrochemical impacts on natural aquatic communities is still incipient (Pratt et al. 1997, Readman et al. 2004). Readman et al. (2004) demonstrated the applicability and sensitivity of high resolution pigment analyses to quantitatively investigate toxic effects on natural phytoplanktonic communities. We have used a relatively large variety of environmental parameters and techniques to assess the potential effects of herbicide contamination of aquatic environments. One important goal was to identify simple methods that could provide

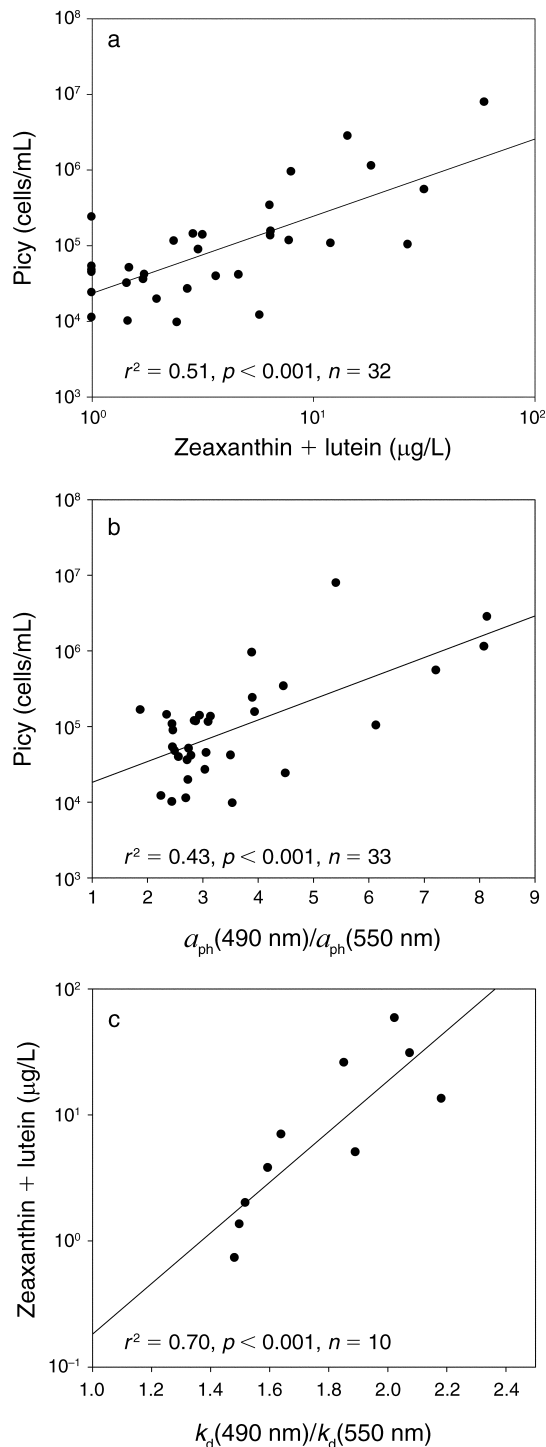


FIG. 6. (a) Positive linear relationship obtained between picy cell abundance and zeaxanthin + lutein concentration; (b) positive linear relationship obtained between picy abundance and $a_{ph}(490)/a_{ph}(550)$; (c) positive linear relationship obtained between zeaxanthin + lutein concentration and $k_d(490)/k_d(550)$.

reliable assessments of changes in the functioning of ecosystems (see Pratt et al. 1997).

The inherent and apparent optical properties of water differed significantly between treated and untreated mesocosms. In turn, a great deal of the differences in spectral attenuation (e.g., the $k_d(490\text{ nm})/k_d(550\text{ nm})$) could be explained by differences in the pigment composition of phytoplankton, particularly the increase in zeaxanthin + lutein, which paralleled the increase in picocyanobacteria. This correlation strongly suggests that the main pigment was zeaxanthin and that little, if any lutein was actually present. Our ability to detect changes in the phytoplankton assemblage through the analysis of pigment composition and the optical properties of the water is certainly encouraging, as both methods demand only a fraction of the time and resources required for taxonomic identifications.

CONCLUSIONS

Agriculture has always impacted natural ecosystems to different extents. Within the last decades, pesticides have emerged as novel stressors with potential for directly or indirectly affecting non-target microbial aquatic communities. The worldwide adoption of glyphosate based herbicides, such as the commercial formulation Roundup, has been fueled by the development of GR crops. An open controversy exists regarding the magnitude of the environmental effects that may follow the recent pervasive changes in agricultural practices. In contrast to the manufacturers' claims on the environmental safety of glyphosate, several studies have demonstrated that glyphosate alone or in combination with the additives used in commercial formulations may be damaging to aquatic biota. Our study builds upon the wealth of previous works, by demonstrating that glyphosate may affect phytoplankton and periphyton community composition. To the best of our knowledge, this is the first time that glyphosate have been shown to stimulate the development of picocyanobacteria in experimental mesocosms. Such increase occurred at the expense of larger algae, and has important potential implications for higher trophic levels (a possibility that we are currently pursuing). It is therefore not only conceivable, but also quite likely that current agricultural practices, which heavily relies upon continual additions of glyphosate at regional scales may alter the structure and function of many natural aquatic environments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Alicia Ronco for her advice on glyphosate analysis and Isidoro Sorokin from Gleba S. A. for his gift of technical-grade glyphosate. This work was supported by CONICET PIP 5614 and Universidad Nacional de General San Martín grant S-05/19.

LITERATURE CITED

Ali, A., and R. A. Fletcher. 1978. Phytotoxic action of glyphosate and amitrole on corn seedlings. *Canadian Journal of Botany* 56:2196–2202.

- American Publication Health Association. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. American Publication Health Association, Washington, D.C., USA.
- Austin, A. P., G. E. Harris, and W. P. Lucey. 1991. Impact of an organophosphate herbicide (glyphosate®) on periphyton communities developed in experimental streams. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 47:29–35.
- Bell, S. G., and G. A. Codd. 1996. Detection analysis and risk assessment of cyanobacterial toxins. Pages 109–122 in R. E. Hester and R. M. Harrison, editors. *Agricultural chemicals and the environment. Issues in environmental science and technology no. 5*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Bowmer, K. H. 1982. Adsorption characteristics of seston in water: implications for the use of aquatic herbicides. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 33: 443–458.
- Bricaud, A., and D. Stramski. 1990. Spectral absorption of living phytoplankton and non algal biogenous matter: a comparison between the Peru upwelling area and the Sargasso Sea. *Limnology and Oceanography* 35:562–582.
- Campbell, W. F., J. O. Evans, and S. C. Reed. 1976. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. *Weed Science* 24:22–25.
- Carmichael, W. W. 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* 270:78–86.
- Caron, D. A. 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nano-phytoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Applied Environmental Microbiology* 46:491–498.
- Cedergreen, N., and J. C. Streibig. 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Management Science* 61:1152–1160.
- Duke, S. O., S. R. Baerson, and A. M. Rimando. 2003. Herbicides: glyphosate. In J. R. Plimmer, D. W. Gammon, and N. N. Ragsdale, editors. *Encyclopedia of agrochemicals*. John Wiley and Sons, New York, New York, USA [doi:10.1002/047126363X.agr.119].
- Feng, J. C., D. G. Thompson, and P. Reynolds. 1990. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 1. Aquatic residues and off-target deposit assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38:1110–1118.
- Folmar, L. C., H. O. Sanders, and A. M. Julin. 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 8:269–278.
- Franz, J. E., M. K. Mao, and J. A. Sikorski. 1997. Glyphosate. A unique global herbicide. American Chemistry Society, ASC Monographs 189:1–600.
- Gardner, S. C., C. E. Grue, J. M. Grassley, L. A. Lenz, J. M. Lindenauer, and M. E. Seeley. 1997. Single species algal (*Ankistrodesmus*) toxicity tests with Rodeo® and Garlon® 3a. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 59: 492–499.
- Giesy, J. P., S. Dobson, and K. R. Solomon. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Review of Contamination and Toxicology* 167:35–120.
- Glass, R. L. 1987. Phosphate adsorption by soils and clay minerals. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 35:497–500.
- Goldsborough, L. G., and A. E. Beck. 1989. Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds. *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 18:537–544.
- Goldsborough, L. G., and D. J. Brown. 1988. Effect of glyphosate (Roundup® formulation) on periphytic algal photosynthesis. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 41:253–260.
- Goldsborough, L. G., and D. J. Brown. 1989. Rapid dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and

- sediments of boreal forest ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12:1139–1147.
- Goldsborough, L. G., and D. J. Brown. 1993. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12:1139–1147.
- Gresshoff, P. M. 1979. Growth inhibition by glyphosate and reversal of its action by phenylalanine and tyrosine. *Australian Journal of Plant Physiology* 6:177–185.
- Gustavson, K., F. Mohlenberg, and L. Schlüter. 2003. Effects of exposure duration of herbicides on natural stream periphyton communities and recovery. *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 45:48–98.
- Hance, R. 1976. Adsorption of glyphosate by soils. *Pesticide Science* 7:363–366.
- Hartman, W. A., and D. B. Martin. 1985. Effects of four agricultural pesticides on *Daphnia pulex*, *Lemna minor*, and *Potamogeton pectinatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 35:646–651.
- Hawley, G. R. W., and B. Whitton. 1991. Survey of algal picoplankton from lakes in five continents. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* 24:1220–1222.
- Hernando, F., M. Royuela, A. Muñoz-Rueda, and C. Gonzalez-Murua. 1989. Effect of glyphosate on the greening process and photosynthetic metabolism in *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Plant Physiology* 134:26–31.
- Hoagland, K. D., J. P. Carder, and R. L. Spawn. 1996. Effects of organic toxic substances. Pages 469–496 in R. J. Stevenson, M. L. Bothwell, and R. L. Lowe, editors. *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Hurley, J. P. 1988. Analysis of aquatic pigments by high performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Purificación* 3:12–16.
- Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias. 2003. La sustentabilidad de la producción agropecuaria Argentina. (www.inta.gov.ar)
- Izaguirre, I., and A. Vinocur. 1994. Typology of shallow lakes of the Saldo River basin (Argentina), based on phytoplankton communities. *Hydrobiologia* 277:49–62.
- James, C. 2003. Global status of commercialized transgenic crops. *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* 30.
- Kallqvist, T., M. I. Abdel-Hamid, and D. Berge. 1994. Effects of agricultural pesticides on freshwater plankton communities in enclosures. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* 13(Supplement):133–152.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kishino, M., C. R. Booth, and N. Okami. 1984. Underwater radiant energy absorbed by phytoplankton, detritus, dissolved organic matter, and pure water. *Limnology and Oceanography* 22:340–349.
- Kreutzweiser, D. P., P. D. Kingsbury, and J. C. Feng. 1989. Drift response of stream invertebrates to aerial applications of glyphosate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 42:331–338.
- Lapitz, R., G. Evia, and E. Gudynas. 2004. Soja y Carne en el Mercosur. Coscoroba, Montevideo, Uruguay.
- Laurion, I., A. Lami, and R. Sommaruga. 2002. Distribution of mycosporine-like amino acids and photoprotective carotenoids among freshwater phytoplankton assemblages. *Aquatic Microbial Ecology* 26:283–294.
- Lowe, R. L., and Y. Pan. 1996. Benthic algal communities as biological monitors. Pages 705–740 in R. J. Stevenson, M. L. Bothwell, and R. L. Lowe, editors. *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Mantoura, R. F. C., and C. A. Llewellyn. 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 151:297–314.
- Masson, S., B. Pinel-Allow, and B. H. Smith. 2000. Total phosphorus–chlorophyll *a* size fraction relationships in southern Québec lakes. *Limnology and Oceanography* 45:732–740.
- Miles, C. J., L. R. Wallace, and H. A. Moye. 1986. Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl) phosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic labeling with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 69:458–461.
- Mitchell, B. G., and D. A. Kiefer. 1988. Variability in pigment specific particulate fluorescence and absorption spectra in the northeastern Pacific Ocean. *Deep-Sea Research* 35:665–689.
- Mitchell, D. G., P. M. Chapman, and T. J. Long. 1987. Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 39:1028–1035.
- Newton, M., K. M. Howard, B. R. Kelpsas, R. Danhaus, C. M. Lottman, and S. Dubelman. 1984. Fate of glyphosate in an Oregon forest ecosystem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32:1144–1151.
- Nomura, N. S., and H. W. Hilton. 1977. The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils. *Weed Research* 17:113–121.
- Pechlaner, R. 2002. Glyphosate in herbicides: an overlooked threat to microbial bottom-up processes in freshwater systems. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* 28:1831–1835.
- Porter, K. C., and Y. S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25:943–948.
- Powell, H. A., N. W. Kerby, and P. Rowell. 1991. Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. *New Phytology* 119:421–426.
- Powell, H. A., N. W. Kerby, P. Rowell, D. M. Mousdale, and J. R. Coggins. 1992. Purification and properties of a glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Planta* 188:484–490.
- Pratt, J. R., A. E. Melendez, R. Barreiro, and N. J. Bowers. 1997. Predicting the ecological effects of herbicides. *Ecological Applications* 7:1117–1124.
- Rankin, L. M., P. D. Franzmann, T. A. McMeekin, and H. R. Burton. 1997. Seasonal distribution of picocyanobacteria in Ace Lake, a marine-derived Antarctic lake. Pages 178–184 in B. Battaglia, J. Valencia, and D. W. H. Walton, editors. *Antarctic communities, species, structure and survival*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Readman, J. W., R. A. Devilla, G. Tarran, C. A. Llewellyn, T. W. Fileman, A. Easton, P. H. Burkill, and R. F. C. Mantoura. 2004. Flow cytometry and pigment analyses as tools to investigate the toxicity of herbicides to natural phytoplankton communities. *Marine Environmental Research* 58:353–358.
- Relyea, R. A. 2004. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1737–1742.
- Relyea, R. A. 2005a. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15:618–627.
- Relyea, R. A. 2005b. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* 15:1118–1124.
- Relyea, R. A., N. M. Schoeppner, and J. T. Hoverman. 2005. Pesticides and amphibians: the importance of assemblage context. *Ecological Applications* 15:1125–1134.
- Ringuet, R. 1972. Tipología de las lagunas de la Provincia de Buenos Aires. *La Limnología Regional y los Tipos Lagunares*. *Physis* 31:55–76.

- Ringuelet, R., A. Salibián, E. Claverie, and S. Ilhero. 1968. Limnología química de las Lagunas Pampásicas. *Physis* 17: 201–221.
- Rohr, J. R., and P. W. Crumrine. 2005. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications* 15:1135–1147.
- Roy, D. N., S. K. Konar, S. Banerjee, D. A. Charles, D. G. Thompson, and R. Prasad. 1989. Uptake and persistence of the herbicide glyphosate in fruit of wild blueberry and red raspberry. *Canadian Journal of Forest Research* 19:842–847.
- Rueppel, M. L., B. B. Brightwell, J. Schaefer, and J. T. Marvel. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25:517–528.
- Sáenz, M. E., W. D. Di Marzio, J. L. Alberdi, and M. del Carmen Tortorelli. 1997. Effects of technical grade and a commercial formulation of glyphosate on algal population growth. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59:638–644.
- Schaffer, J. D., and M. J. Sebetich. 2004. Effects of aquatic herbicides on primary productivity of phytoplankton in the laboratory. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72:1032–1037.
- Servizi, J. A., R. W. Gordon, and D. W. Martens. 1987. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia*, and trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 39:15–22.
- SETAC-RESOLVE. 1992. Workshop on aquatic microcosm for ecological assessment of pesticides. The SETAC Foundation for Environmental Education and Resolve (a program of the World Wildlife Fund), Wintergreen, Virginia, USA.
- Sprankle, P. W., F. Meggitt, and D. Penner. 1975a. Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Science* 23:224–228.
- Sprankle, P. W., F. Meggitt, and D. Penner. 1975b. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science* 23:229–234.
- Steeman-Nielsen, E. 1952. The use of radioactive carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil* 18:117–140.
- Stockner, J. G. 1988. Phototrophic picoplankton: An overview from marine and freshwater ecosystems. *Limnology and Oceanography* 33:765–775.
- Streit, B. 1992. Bioaccumulation processes in ecosystems. *Experientia* 48:955–970.
- Sun, J., and D. Liu. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25(11):1331–1346.
- Thompson, D. G., B. F. Wojtaszek, B. Staznik, D. T. Chartrand, and G. R. Stephenson. 2004. Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. *Environmental Contamination and Toxicology* 23:843–849.
- Trüper, H. G., and C. S. Yentsch. 1967. Use of glass fiber filters for the rapid preparation of in vivo absorption spectra of photosynthetic bacteria. *Journal of Bacteria* 94:1255–1256.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1993. Registration eligibility decision (RED): glyphosate. Office of Pesticide Programs. U.S. Environmental Protection Agency, Special Review and Registration Division, Washington, D.C., USA.
- Utermöhl, H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Limnologie* 9:1–38.
- Venrick, E. L. 1978. How many cells to count? Pages 167–180 in A. Sournia, editor. *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris, France.
- Wan, M. T., R. G. Watts, and D. J. Moul. 1989. Effects of different dilution water types on the acute toxicity to juvenile Pacific salmonids and rainbow trout of glyphosate and its formulated products. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 43:378–385.
- Wynn-Williams, D. D. 1992. Direct quantification of microbial propagules and spores. Pages 1–34 in D. D. Wynn-Williams, editor. *Biotas manual of methods*. Scientific Committee on Antarctic Research, Cambridge, UK.
- Zaranyika, M. F., and G. M. Nyandoro. 1993. Degradation of glyphosate in the aquatic environment: an enzymatic kinetic model that takes into account microbial degradation of both free and colloidal (or sediment) particle adsorbed glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:838–884.

APPENDIX

Major physical-chemistry constituents of ponds for each treatment at initial condition and after Roundup addition (*Ecological Archives* A017-094-A1).

New evidences of Roundup[®] (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems

María S. Vera · Leonardo Lagomarsino · Matías Sylvester · Gonzalo L. Pérez ·
Patricia Rodríguez · Hernán Mugni · Rodrigo Sinistro · Marcela Ferraro ·
Carlos Bonetto · Horacio Zagarese · Haydée Pizarro

Accepted: 18 November 2009 / Published online: 29 November 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Argentina is the second largest world producer of soybeans (after the USA) and along with the increase in planted surface and production in the country, glyphosate consumption has grown in the same way. We investigated the effects of Roundup[®] (glyphosate formulation) on the periphyton colonization. The experiment was carried out over 42 days in ten outdoor mesocosms of different typology: “clear” waters with aquatic macrophytes and/or metaphyton and “turbid” waters with great occurrence of phytoplankton or suspended inorganic matter. The herbicide was added at 8 mg L⁻¹ of the active ingredient (glyphosate) in five mesocosms while five were left as controls (without Roundup[®] addition). The estimate of the dissipation rate (*k*) of glyphosate showed a half-life value of 4.2 days. Total phosphorus significantly increased in

treated mesocosms due to Roundup[®] degradation what favored eutrophication process. Roundup[®] produced a clear delay in periphytic colonization in treated mesocosms and values of the periphytic mass variables (dry weight, ash-free dry weight and chlorophyll *a*) were always higher in control mesocosms. Despite the mortality of algae, mainly diatoms, cyanobacteria was favored in treated mesocosms. It was observed that glyphosate produced a long term shift in the typology of mesocosms, “clear” turning to “turbid”, which is consistent with the regional trend in shallow lakes in the Pampa plain of Argentina. Based on our findings it is clear that agricultural practices that involve the use of herbicides such as Roundup[®] affect non-target organisms and the water quality, modifying the structure and functionality of freshwater ecosystems.

M. S. Vera · M. Sylvester · P. Rodríguez · R. Sinistro ·
H. Pizarro (✉)
Laboratorio de Limnología, Departamento de Ecología, Genética
y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires, Pab. II, C1428EHA, Buenos
Aires, Argentina
e-mail: hay@ege.fcen.uba.ar; haydeepizarro@gmail.com

L. Lagomarsino · G. L. Pérez · M. Ferraro · H. Zagarese
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto
Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), Camino
Circunvalación Laguna Km 6, CC 164, 7130 Chascomús,
Argentina

H. Mugni · C. Bonetto
Instituto de Limnología Dr. Ringuet, Avenida Calchaquí km
23.5, 1888, Florencio Varela, Buenos Aires, Argentina

M. S. Vera · L. Lagomarsino · G. L. Pérez · P. Rodríguez ·
H. Mugni · R. Sinistro · M. Ferraro · C. Bonetto ·
H. Zagarese · H. Pizarro
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas,
Buenos Aires, Argentina

Keywords Roundup[®] · Glyphosate · Periphyton ·
Water quality · Mesocosms · Clear and turbid shallow lakes

Introduction

In Argentina, the area planted with soybean has increased from 370,000 to 17 million hectares (ha) since 1996. Almost 50% of the total planted area in the country (30 million ha in 2004/2005, Trigo and Cap 2006) was devoted to soybeans and more than 98% is glyphosate-tolerant. Nowadays, Argentina is the second largest world producer of soybeans (after the USA, James 2007) and along with the increase in planted surface and production in the country, glyphosate consumption has grown in the same way. Moreover, glyphosate is used not only for soybeans, but also for other crops like maize, cotton and canola, and for chemical fallow. This agricultural practice is a weed control mediated by the herbicide, for the

preservation of soil water content to be used by different crops in rotation. These circumstances led Argentina to use 162 million kg of glyphosate in 2007 (CASAFA 2009). The speed at which the adoption of the new technologies evolved is an important fact but its consequences for the environment aren't yet fully understood.

Glyphosate [*N*-(phosphonomethyl)glycine] is a non-selective, broad spectrum, post-emergent agrochemical widely used in agriculture and silviculture in many countries for the control of grasses, sedges and broad-leaved weeds (Goldsborough and Brown 1988). Glyphosate's primary mode of action in plants and several microorganisms is the disruption of aromatic amino acid biosynthesis, through the inhibition of the enzyme 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphate synthase (EPSPS), which halts the production of chorismate (Amrhein et al. 1980). The process ultimately results in the cessation of aromatic amino acid synthesis, which in turn reduces protein synthesis and growth, and eventually causes cellular disruption and death (Salisbury and Ross 1994).

Nowadays, the products commonly used are formulations of glyphosate (e.g., Accord®, AquaMaster™, Rodeo®, Rondo®, Roundup®, Touchdown®), which in addition to the active ingredient include water and a surfactant system that enables the product to adhere to the surface of leaves so the active ingredient can penetrate them. Because of this, most of the studies carried out on the effects of glyphosate in aquatic environments have been performed using glyphosate formulations. Among these commercial formulations, one of the most used in the world is Roundup®, which contains 480 g L⁻¹ of glyphosate, as the isopropylamine salt, and a surfactant, polyoxyethylene amine or POEA.

Glyphosate is usually assumed to be safe and non-toxic to the environment due to its fast biodegradation and/or adsorption by soil particulates. Nevertheless, off-target displacements from soils have already been reported (Peruzzo et al. 2008). Glyphosate may reach aquatic systems either by accidental or wind driven drift of the herbicide spray, or through transport in surface runoff (Edwards et al. 1980) and suspended particulate matter (Feng et al. 1990; Goldsborough and Beck 1989). It has been observed in Argentina that another way that glyphosate may reach water bodies is by direct human action, washing the tanks of the fumigation machines in streams and shallow water bodies near cultivation fields.

Most of the literature dealing with glyphosate impacts on aquatic organisms is based on laboratory bioassays (e.g., Relyea 2004; Schaffer and Sebetich 2004). Many toxicity studies are based on the effects on individuals, frequently only on a single species. Although this is a rapid way to identify the direct impacts of pesticides on organisms, it doesn't provide information about possible effects on

organisms in their natural environments (Relyea 2005a). Field studies, on the other hand, have mostly focused on fish (Cavalcante et al. 2008; Langiano and Martinez 2008), invertebrates (Henry et al. 1994; Tsui et al. 2005), and amphibians (Costa et al. 2008; Relyea 2005b; Relyea et al. 2005). Monospecific tests may not be representative of what happens to populations present in natural waters and it is not possible to extrapolate the effects on the ecosystem from single species bioassays. That is the reason why studies on experimental mesocosms are so important, because they resemble the effect on natural communities and ecosystems as a whole.

Considering the amounts of glyphosate used in Argentina the gap in research on the impacts of this herbicide on the region is surprising. Most local research took laboratory bioassays into account, using freshwater algae (Asselborn and Zalocar de Domitrovic 1998; Sáenz et al. 1997), macrophytes and invertebrates (Achiorno et al. 2008). Others assessed glyphosate effects on *Lemna gibba* using field and laboratory studies (Sobrero et al. 2007). Scarce information is available on the effect of glyphosate based herbicides at community and/or ecosystem level (Pérez et al. 2007) despite the utility of this kind of studies.

Periphyton is a very important community in aquatic ecosystems and its role is very significant in shallow lakes where there is a great variety of habitats for its establishment considering the high proportion of littoral areas. Its importance in terms of production is evident in "clear" waters where its contribution to the total microbial production of the system is more than 77% greater than that of phytoplankton (Liboriussen and Jeppesen 2003). Periphyton possesses many attributes that makes it an ideal community to employ in water quality monitoring investigations. Because periphyton is a sessile community, it cannot avoid potential pollutants through migration or other means. Because periphyton integrates the influences of environmental conditions over long periods of time, they have been widely applied for monitoring purposes (Sabater and Admiral 2005). Some studies focused on the effect of Roundup® on structural and functional features of the periphytic algal fraction (Goldsborough and Brown 1988; Holtby and Baillie 1989) while Austin et al. (1991) used Vision®, another glyphosate-based herbicide, for a similar purpose.

The objective of the present study was to investigate the effect of the glyphosate formulation Roundup® on the periphyton accrual from water bodies with limnological properties similar to those on the Pampean plain of Argentina. We analysed the colonization of periphyton by means of structural and functional features of the community developed in artificial substrata placed in mesocosms that simulated different freshwater ecosystems. The experiment was carried out in ten shallow artificial lakes

(mesocosms) with the same morphometry but with different limnological characteristics, some with “clear” waters with aquatic macrophytes and/or metaphyton and others with “turbid” waters with a major presence of phytoplankton or suspended inorganic matter. The impact of the herbicide on the water quality of a heterogeneous group of shallow lakes was also discussed.

Materials and methods

Mesocosms’ description

The experiment was carried out in 2006, between April and June, at the IIB-INTECH (National Institute of Biotechnological Investigations—National Technological Institute of Chascomús), Chascomús, Buenos Aires province, Argentina. The experiment employed artificial outdoor mesocosms which have a history of serving as useful experimental venues for ecotoxicological studies employing Roundup®. The ten mesocosms (depth: 1.2 m; area: 25 m²), constructed in an area of approximately 1 ha, were built by accumulation and leveling of the land to form a hill where the excavations were made. Each excavation, which would be a mesocosm, was lined with black nylon for isolation to prevent percolation. The bottom of each excavation was covered with soil from places nearby to provide sediments to each environment (Fig. 1). Finally, they were filled with well water and were left to evolve. The first experiment, where the impact of Roundup® on microbial communities was tested, was developed during 2005. After the end of this experiment and in order to start the present study, the mesocosms were dried and afterwards refilled with new water. Before the refill, five mesocosms were randomly selected for Roundup® addition, with five to remain as controls. After the complete refill, the mesocosms were left to evolve naturally for about 1 year up to the beginning of the new experiment. At that moment, the ten mesocosms displayed different limnological characteristics, showing the typology representative of shallow lakes of the Argentine Pampean plain (Allende et al. 2009; Izaguirre and Vinocur 1994; Quirós and Drago 1999). The ten mesocosms were mainly eutrophic, with or without plants (rooted macrophytes and/or metaphyton), with clear to turbid waters. Turbidity was originated by organic (phytoplankton) or inorganic compounds (suspended matter).

Experimental design

At the beginning of the present experiment, five mesocosms were treated with Roundup® in order to attain an initial concentration of 8 mg glyphosate as active

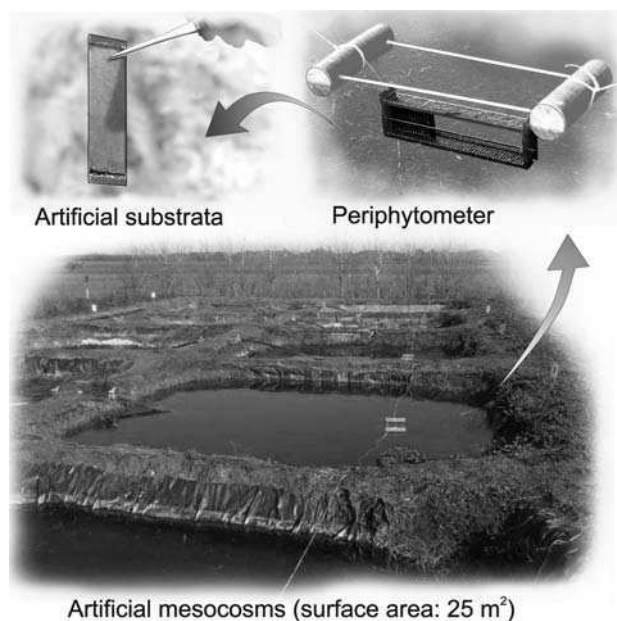


Fig. 1 Scheme with pictures of the outdoor mesocosms built for the experiment, a periphytometer and an artificial substratum for periphyton colonization

ingredient per L⁻¹ in each treated mesocosm. The remaining five mesocosms were left as controls (without Roundup® addition). The nominal concentration of glyphosate was selected to be comparable and intermediate to the concentrations assayed in a previous experiment (Pérez et al. 2007). The tested concentration lies towards the higher edge of the range reviewed by Relyea (2006) as worst case scenarios, ranging between 1.4 (Canadian government) and 10.3 a.i. mg L⁻¹ (Mann and Bidwell 1999).

Water samples were collected from each mesocosm on six occasions using a Van Dorn-style bottle. The first samples were collected immediately before herbicide application (*t*0), except those for glyphosate determination that were collected immediately after application. The remaining samples were collected 3, 8, 14, 28 and 42 days after Roundup® application (*t*1–*t*5, respectively). The water samples were transported in 5-L plastic containers from which subsamples were taken for glyphosate determinations and analyses of physical, chemical and biological variables. The study of the periphyton assemblage was performed using artificial substrates which were placed in each mesocosm at the beginning of the experiment. Figure 1 shows a schedule of the mesocosms and the materials for periphyton analysis.

Statistical analyses

The Kruskal–Wallis non-parametric ANOVA by ranks test (KW) was used to compare the water chemistry variables

of “clear” and “turbid” mesocosms at t_0 and between treatments over the course of the experiment. Simple linear regression analyses were performed, for each treatment, for log-transformed periphytic variables versus time. Prior to each regression analysis, Kolmogorov–Smirnov and Levene’s tests were run in order to check data for normality and homoscedasticity, respectively. Regression analyses with auxiliary (dummy) variables were performed to test homogeneity between slopes, and differences between intercepts were assayed using analyses of variance procedures ($P < 0.05$).

Periphyton analysis

A special device (periphytometer), containing clear polycarbonate strips (1 mm thick) of known surface that served as artificial substrata, was suspended approximately 10 cm below the water surface in each mesocosm in special frames at the beginning of the experiment (Fig. 1). The substrata were allowed to be colonized by a periphytic community and samples were collected 8, 14, 28 and 42 days from the beginning of the experiment. On each sampling date, the periphyton on each substrate was removed by means of a fine brush and divided into aliquots for different analyses. Samples for qualitative algal determinations were fixed with 2% formalin and analyzed under an optical microscope at 1,000× magnification. Water samples for quantitative analysis were preserved with 1% acidified Lugol’s iodine solution. Counts of periphyton algae were performed using the inverted microscope technique (Utermöhl 1958) at 400× magnification. The counting error (<15%) was estimated according to Venrick (1978).

The following variables were also considered: live and dead diatom abundance, algal classes’ percentages, chlorophyll *a* concentration (P-Chl *a*), dry weight (DW), ash-free dry weight (AFDW) and primary production (PP). We considered as dead diatoms those individuals that presented a disorganized chloroplast at microscope level and/or broken frustules. All periphytic variables were expressed on an area basis. Periphyton chlorophyll *a* concentration was estimated from scraped material filtered through Whatman® GF/F filters. Filters were immediately wrapped in aluminum foil and stored at -80°C until processing. Pigments were extracted (overnight, at 4°C , in the dark in a nitrogen-saturated atmosphere) using 90% (by volume) aqueous acetone and the extracts were cleared by centrifugation at 3,000 rpm for 10 min. Pigment extracts were measured by ion pairing reverse-phase HPLC (modified from Mantoura and Llewellyn 1983) using an Aktabasic chromatograph (Amersham, Buckinghamshire, UK) controlled by the Unicorn program (Amersham, Buckinghamshire, UK). The method employed is described in Laurion et al. (2002). The HPLC system was calibrated

with commercially available chlorophyll *a* standard from Sigma (Buchs, Switzerland).

DW was estimated from samples filtered through Whatman® GF/C filters pre-combusted to 440°C for 2 h prior to use and later weighting of the material dried at 60°C on a stove. AFDW was determined as the mass difference after 3 h’ calcination (440°C) of dry samples (APHA 2005).

PP was estimated by the ^{14}C -technique (Steeman-Nielsen 1952). One colonized substratum was incubated for 2 h in a 70 mL acrylic tube (clear cut-off at 400 nm) placed at the surface of an outdoor water bath. For each mesocosm, two tubes were incubated at a saturating, but not photoinhibiting irradiance level (ranging from 41.85 to 104.54 W m^{-2}), obtained by using a neutral density filter. The irradiance level was decided based on preliminary production *versus* irradiance curves. In addition, a single dark tube per mesocosm was used to estimate dark ^{14}C incorporation. Three μCi of ^{14}C labeled NaHCO_3 were added to each tube. After incubation, the material was scraped from the substratum side facing the light. This side was marked with an innocuous label prior to use. The scraped material was filtered through Whatman® GF/F filters, placed in a HCl saturated atmosphere and dried overnight. The activity of filters was measured in a scintillation counter with 2.5 mL of OptiPhase “HiSafe”3 scintillation solution. Dissolved inorganic carbon was determined from alkalinity by Gran titration, pH, and temperature (Stumm and Morgan 1996).

Physical and chemical variables of the mesocosms’ water

Physical and chemical analyses were performed 3, 8, 14, 28 and 42 days after the Roundup® addition. Conductivity (Hach conductimeter), pH (Orion pH meter) and dissolved oxygen concentration (YSI 5000 meter) were measured *in situ* on each sampling date. Water temperature was recorded sub-superficially over the course of 1 day at t_5 (after 42 days) in mesocosms E1 and E3 with a THERMO-BUTTON Data Logger. At t_0 water transparency was recorded in each mesocosm from vertical profiles of downward irradiance measurements (380–750 nm, every 1 nm), using a spectra-radiometer (USB2000, Ocean Optics). Profiles were obtained around 1 h from astronomic noon. Broadband (K_d PAR) vertical diffuse attenuation coefficients, for downwelling irradiance, were calculated by regressing log-transformed irradiance measurements against depth. Nephelometric turbidity values (Tn) were measured with an underwater turbidimeter (SCUFA, Turner®). Phytoplankton chlorophyll *a* was monitored daily using an underwater turbidimeter (SCUFA, Turner®).

Water samples for chemical analysis of major ions and nutrients were filtered immediately after sampling through

Whatman® GF/C filters. Soluble reactive phosphorus (SRP) was measured by the molybdate-ascorbic method, nitrate by the hydrazine reduction method followed by nitrite determination by diazotation and ammonium by the indophenol blue method, following the APHA (2005). Calcium and magnesium (atomic absorption spectrometry), sodium and potassium (flame photometry), bicarbonate (titration), sulphate (turbidimetry), and chloride (AgNO_3 titration) were determined following the APHA (2005). Total phosphorus (TP) were measured in the same way as SRP after acid digestion of unfiltered water samples.

Analyses of glyphosate were carried out before glyphosate addition in all mesocosms and on five sampling occasions (days 2, 8, 10, 11 and 14) at each treated mesocosm on water samples filtered through a 0.45 μm membrane filter. The analyses were performed by reversed-phase HPLC (high performance liquid chromatography) following derivatization with fluorenylmethyl chloroformate chloride (FMOC chloride), following Miles et al. (1986).

Results

Roundup® effect on periphyton community

Total periphyton mean algal abundance ranged from 9.6×10^4 to 88.2×10^4 indiv cm^{-2} and from 7.4×10^4 to 63.4×10^4 indiv cm^{-2} in control and treated mesocosms, respectively. This variable showed values always higher in control mesocosms, and even though it increased from the beginning of the experiment, an abundant decrease was seen on the last sampling date, for both control and treated mesocosms (Table 1).

During the entire experiment both treatments were dominated by diatoms, ranging from 78.6 to 89.9% in control mesocosms and from 50.6 to 76% in treated mesocosms; an increase of cyanobacteria was observed from the first sampling onward in treated mesocosms (Table 1). The more representative species of diatoms that were registered were the ubiquitous *Gomphonema parvulum*,

Achnanthes minutissima and *Amphora veneta*. Among the cyanobacteria, the more frequent species registered were *Chamaesiphon minutus*, *Chroococcus turgidus*, *Lepidolyngbya faveolarum* and *Merismopedia hyaline*. A higher mortality of diatoms in the first stages of colonization was observed in treated mesocosms (Fig. 2a) but without significant differences between treatments. Diatom abundance (live + dead organisms) 8 days after the beginning of the experiment ranged from 3×10^2 to 1.9×10^5 indiv cm^{-2} and from 4.4×10^2 to 1.1×10^5 indiv cm^{-2} in control and treated mesocosms, respectively (Fig. 2b). From that day onward, diatom abundance increased until day 28 of the experiment and then a slightly decrease was observed. Treated mesocosms always showed significant lower values in relation to control ones at the same time level (slope $P = 0.815$; ordinate $P = 0.026$; Table 2).

Mean DW ranged from 174 to 893 $\mu\text{g cm}^{-2}$ and from 75 to 387 $\mu\text{g cm}^{-2}$; mean AFDW ranged from 63 to 329 $\mu\text{g cm}^{-2}$ and from 24 to 135 $\mu\text{g cm}^{-2}$, and mean P-Chl *a* concentration ranged from 0.4 to 4.9 $\mu\text{g cm}^{-2}$ and from 0.2 to 1.7 $\mu\text{g cm}^{-2}$, in control and treated mesocosms, respectively, over the course of the experiment. Despite the major variation observed among mesocosms as regards periphyton variables (DW, AFDW, P-Chl *a*), values of the mass variables increased all during the experiment and they were always higher in control mesocosms (Fig. 3a–c). Comparing the regression lines obtained from DW, AFDW and P-Chl *a* temporal variations, we obtained significant differences between treated and control mesocosms. Treated mesocosms showed always lower values in relation to control ones at the same time level. The obtained linear regressions showed two lines with similar slope values (DW $P = 0.967$; AFDW $P = 0.967$; P-Chl *a* $P = 0.973$) and significant differences between intercepts (DW $P = 0.002$; AFDW $P = 0.015$; P-Chl *a* $P = 0.018$) for all the mass variables (Table 2) indicative of a delayed colonization of periphyton in treated mesocosms.

At the first periphyton sampling date, the PP ranged from 0.2 to 30.2 $\text{mg C m}^{-2} \text{h}^{-1}$ and from 0.3 to 24.1 $\text{mg C m}^{-2} \text{h}^{-1}$ in control and treated mesocosms, respectively; a slight decrease was observed until the end

Table 1 Mean total algal abundance, percentages of algal classes and mean primary production (PP) values of periphyton in control (C) and treated (T) mesocosms throughout the sampling period

	8 days		14 days		28 days		42 days	
	C	T	C	T	C	T	C	T
Algal abundance (10^4 ind cm^{-2})	9.6 (5.1)	7.4 (3.6)	55.5 (22.6)	38.0 (16.8)	88.2 (26.7)	63.4 (45.5)	64.3 (9.9)	48.9 (22.2)
Clorophyta (%)	12.8 (2.2)	21.7 (3.1)	6.9 (0.7)	18.2 (2.3)	5.1 (0.7)	15.3 (1.4)	8.4 (0.9)	6.9 (0.5)
Cyanobacteria (%)	8.5 (1.6)	24.3 (2.1)	12.2 (2.3)	31.3 (3.3)	4.9 (0.3)	20.8 (3.1)	11.0 (1.5)	15.4 (1.6)
Diatoms (%)	78.6 (3.8)	53.9 (3.7)	80.8 (2.8)	50.6 (4.1)	89.9 (0.7)	63.1 (3.5)	80.5 (2.3)	76.0 (2.4)
PP ($\text{mg C m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	14.9 (5.3)	6.7 (4.6)	9.8 (2.3)	5.5 (2.9)	10.6 (2.5)	4.0 (1.6)	8.3 (1.9)	6.1 (1.6)

Standard error in brackets

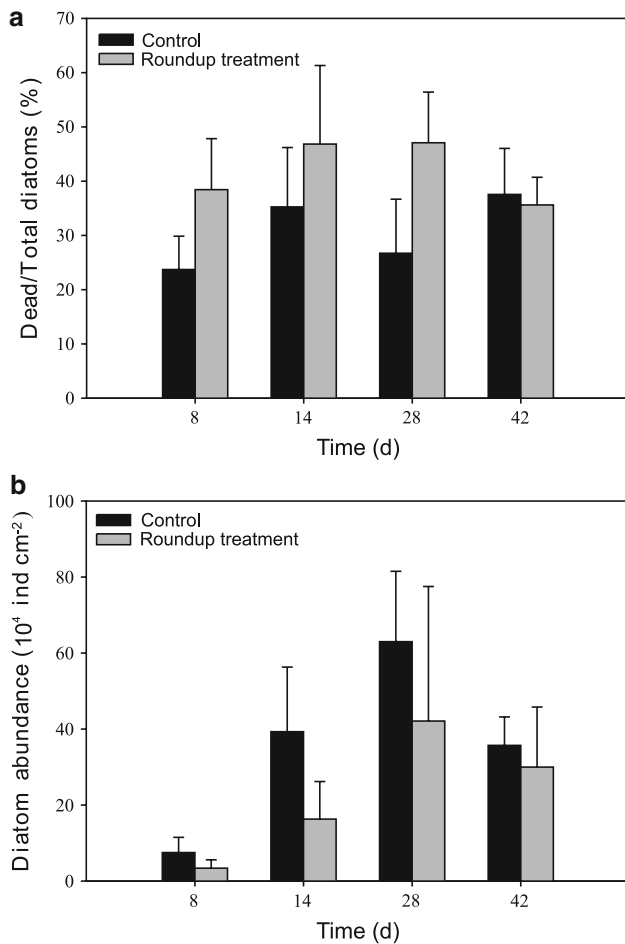


Fig. 2 **a** Mean ratio of dead/total diatoms and **b** diatom abundance in treated and control mesocosms throughout the sampling period. Error bars represent +1 SE

Table 2 Linear regression coefficients, origin ordinate and slope for control and treated mesocosms, for dry weight (DW), ash-free dry weight (AFDW), periphyton chlorophyll *a* concentration (P-Chl *a*) and diatom abundance (Diatoms)

	Ordinate (mean ± SE)		Slope (mean ± SE)	
	Control	Treated	Control	Treated
DW	2.03 ± 0.16	1.51 ± 0.29	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
	<i>(P</i> = 0.002)		<i>(P</i> = 0.967)	
AFDW	1.54 ± 0.21	1.10 ± 0.27	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
	<i>(P</i> = 0.015)		<i>(P</i> = 0.967)	
P-Chl <i>a</i>	-0.70 ± 0.29	-1.24 ± 0.32	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
	<i>(P</i> = 0.018)		<i>(P</i> = 0.973)	
Diatoms	4.37 ± 0.37	3.58 ± 0.46	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02
	<i>(P</i> = 0.026)		<i>(P</i> = 0.815)	

SE represents the standard error. Significance levels between treatments in brackets

of the experiment (42 days). PP always showed higher mean values in control mesocosms, but without significant differences between treatments (Table 1).

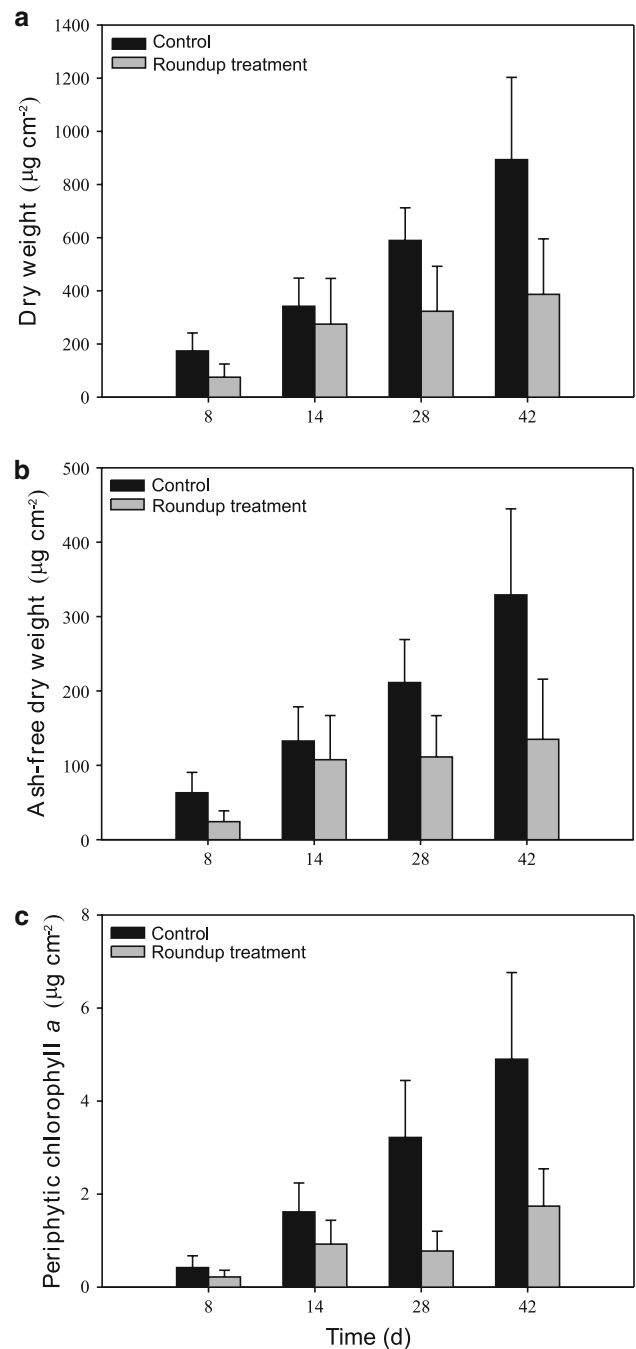


Fig. 3 Mean values of **a** DW, **b** AFDW and **c** chlorophyll *a* concentration in control and treated mesocosms throughout the sampling period. Error bars represent +1 SE

Mesocosms’ water features

The ten mesocosms showed a great heterogeneity in limnological features at the beginning of the experiment. The physical and chemical characteristics before glyphosate addition, at *t*₀, are shown in Table 3. Although the ten mesocosms showed different limnological properties at *t*₀, we classified them considering the profiles of *K*_d(λ) and

Table 3 Environmental variables recorded in each mesocosm (E) at t_0

	E1	E2	E3 ^a	E4	E5	E6 ^a	E7 ^a	E8 ^a	E9 ^a	E10
pH	8.55	9.02	9.39	8.52	8.5	8.38	8.93	8.52	8.89	8.85
Conductivity (mS cm ⁻¹)	2.57	2.72	2.78	2.73	2.79	2.77	2.73	2.61	2.75	2.77
Nephelometric turbidity (NTU)	0.80	9.10	1.90	1.80	16.40	3.50	3.50	0.70	1.60	1.60
K_d PAR (m ⁻¹)	^b	1.77	4.26	0.89	4.11	0.70	^b	1.66	2.26	6.37
Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	10.80	10.20	10.40	10.20	9.50	9.50	10.40	10.50	10.00	10.40
TP (μg L ⁻¹)	153.00	153.00	241.00	131.00	219.00	131.00	110.00	142.00	197.00	438.00
SRP (μg L ⁻¹)	6.40	7.60	3.80	7.60	15.20	9.00	7.60	6.40	4.60	3.80
N-NO ₂ (μg L ⁻¹)	203.00	431.80	340.50	106.70	279.40	193.10	66.10	289.60	223.50	254.00
N-NO ₃ (mg L ⁻¹)	11.29	2.33	1.82	9.83	2.33	8.37	11.65	12.38	6.92	2.98
N-NH ₄ (μg L ⁻¹)	11.80	16.50	15.40	9.50	8.30	14.20	8.30	26.00	4.70	21.00
CO ₃ (mg L ⁻¹)	62.15	95.62	152.99	43.03	52.59	47.81	95.62	47.81	100.40	95.62
HCO ₃ (mg L ⁻¹)	738.79	738.79	646.44	738.79	787.40	743.65	675.61	753.37	690.19	729.07
SO ₄ (mg L ⁻¹)	92.00	73.60	73.60	89.24	82.80	87.40	82.80	84.64	87.40	92.00
Cl (mg L ⁻¹)	394.79	394.79	404.81	324.65	394.79	424.85	404.81	384.77	414.83	354.71
Ca (mg L ⁻¹)	1.61	1.96	2.88	1.73	1.50	3.34	3.34	3.11	2.99	3.45
Mg (mg L ⁻¹)	23.45	28.50	23.35	20.65	14.75	21.95	20.30	21.50	20.45	21.50
Na (mg L ⁻¹)	520.00	615.00	545.00	515.00	440.00	630.00	620.00	590.00	630.00	615.00
K (mg L ⁻¹)	25.00	22.00	23.50	20.50	24.00	24.00	22.00	22.50	25.00	24.50
Phytoplanktonic chlorophyll <i>a</i> (μg L ⁻¹)	16.86	8.43	295.84	33.71	1.26	15.17	40.46	137.38	94.82	255.38
General aspect	Macrophytes	Inorganic	Organic (phytoplankton)	Macrophytes + metaphyton	Inorganic	Inorganic + organic (phytoplankton)	Macrophytes + metaphyton	Macrophytes	Organic (phytoplankton)	Organic (phytoplankton)
State	Clear	Turbid	Turbid	Clear	Turbid	Turbid	Clear	Clear	Turbid	Turbid

^a Roundup[®] added^b = no data

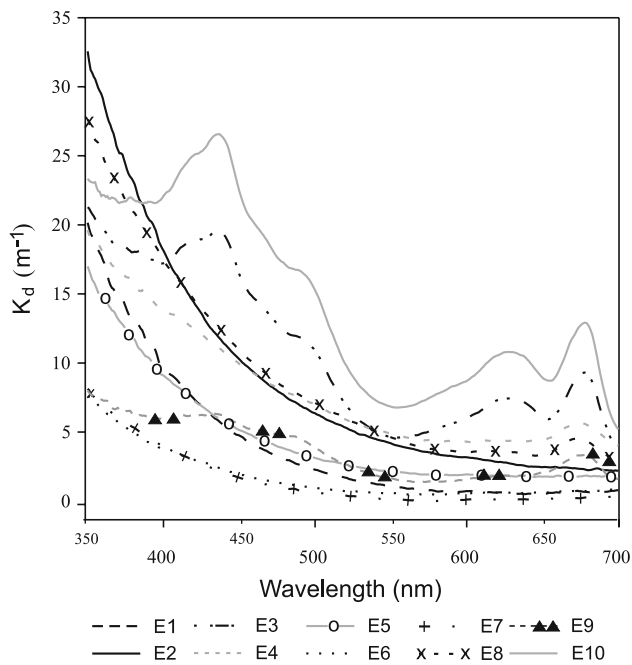


Fig. 4 Profiles of $K_d(\lambda)$ and K_d (PAR) against ultraviolet and photosynthetically active radiation (PAR, 400–700 nm) downward irradiance obtained for each mesocosm (E) at t_0

K_d (PAR) against ultraviolet and photosynthetically active radiation (PAR, 400–700 nm) downward irradiance obtained for each mesocosms at t_0 (Fig. 4), the values of nephelometric turbidity and phytoplanktonic chlorophyll a concentrations. We distinguished two groups of mesocosms: “turbid” (E2, E3, E5, E6, E9 and E10) and “clear” (E1, E4, E7 and E8) (Table 3). In the case of “turbid” mesocosms, some of them contained plenty of phytoplankton (e.g., E10) and others had a high amount of inorganic solids (e.g., E5).

The initial ionic concentrations in the different mesocosms were rather uniform (Table 3). The water was alkaline, attaining high pH (8.8 ± 0.3) and conductivity (2.7 ± 0.1 mS cm^{-1}), bicarbonate plus carbonate being the main anions and sodium the main cation. Dissolved oxygen averaged 10.2 ± 0.4 mg L^{-1} . Nitrate concentrations were high (mean 6.99 mg $N L^{-1}$), showing an extended variation range (1.8 – 12.3 mg $N L^{-1}$) and turned out to be significantly higher in the “clear” than in the “turbid” mesocosms (KW $P = 0.045$). Nitrite was also comparatively high (239 ± 107 $\mu g L^{-1}$), higher than the ammonium concentrations (3.6 ± 6.5 $\mu g L^{-1}$) but without significant differences. SRP concentrations were comparatively low (7.2 ± 3.3 $\mu g L^{-1}$) without significant differences between treatments; the lowest concentrations (3.3 – 4.6 $\mu g L^{-1}$) were measured in mesocosms attaining high phytoplankton development, and the highest (15 $\mu g L^{-1}$) in a mesocosm with high inorganic turbidity

(Table 3). High inorganic nitrogen to SRP ratios, around 1,000, were recorded. TP concentrations ranged between 110 and 438 $\mu g L^{-1}$; the higher concentrations in the “turbid” mesocosms differed significantly from the “clear” ones from the second sampling date onward (KW $P = 0.0001$).

Initial values of phytoplankton chlorophyll a ranged from 11.9 to 280.0 $\mu g L^{-1}$ in more contrasting mesocosms. The Chl a concentrations displayed a significant variation among mesocosms throughout the experiment, independently of glyphosate treatment addition. These variations were maintained during almost all the experiment without significant differences between treatments.

The ionic composition did not show significant differences between treatments throughout the experiment (Table 4). Sodium fluctuated between 475 and 635 mg L^{-1} while bicarbonate fluctuated between 510.3 and 956.5 mg L^{-1} without significant differences between treatments. Water pH ranged from 8.18 to 9.64 and dissolved oxygen from 5.7 to 11.5 mg L^{-1} . Mean water temperature at t_5 was 9.33°C in E1 and 9.77°C in E3. Total P ranged between 88 and 460 $\mu g L^{-1}$ in control mesocosms and between 131 and 1,110 $\mu g L^{-1}$ in Roundup® inoculated mesocosms attaining significant differences between them (KW $P = 0.00003$). TP significantly increased after Roundup® addition in the glyphosate enriched treatments, a subsequent trend to decrease taking place (Fig. 5a). TP dissipation showed a significant lineal trend ($\ln TP = 6.9 - 0.04$ day; $P = 0.0002$) as from the third day after the glyphosate application. After 42 days of glyphosate addition no significant differences were observed between mesocosms with and without Roundup®. The other measured nutrients, ammonium, nitrate, nitrite and SRP, varied during the experiment without showing any discernible pattern. Nitrate concentrations remained higher in the “clear” than in the “turbid” mesocosms. SRP increased from the first to the second sampling and remained high after that in both treatments. This behavior was probably due to phosphate release from sediments after the mixture of waters both in control and treated mesocosms at t_0 , because of glyphosate homogenization in treated mesocosms and in order to repeat the same mechanical action, in control ones. No significant differences were recorded in these nutrients between treatments.

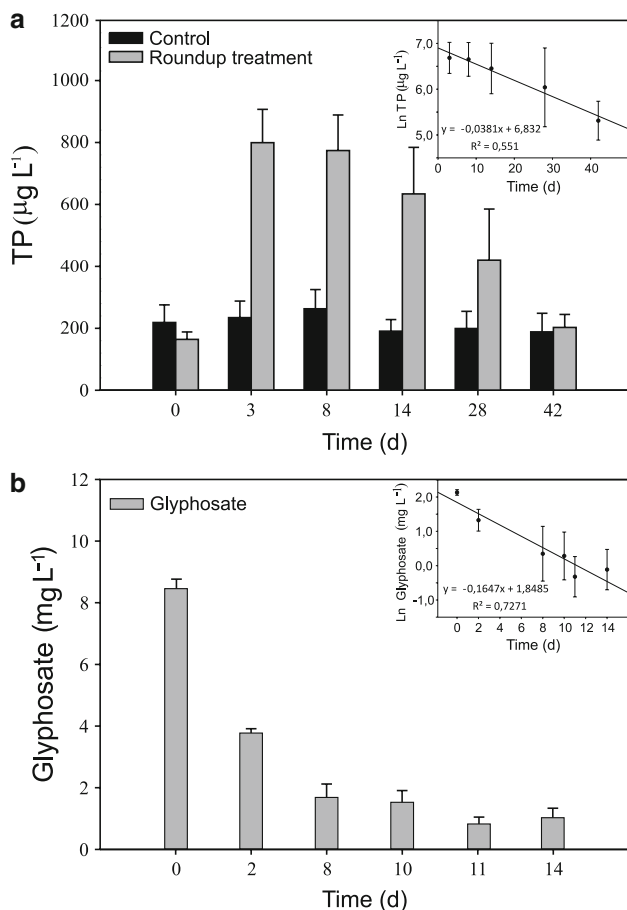
K_d (PAR) did not vary significantly between treatments, averaging 4.28 m^{-1} (± 3.36 SD), and ranging from 0.56 to 16 m^{-1} . Nephelometric turbidity (Tn) did not vary significantly between treatments and values averaged 5.59 NTU (± 5.7 SD), ranging between 0.5 and 24.6 NTU.

Glyphosate evolution

Considering that glyphosate residue adjusted to a logarithmic function assuming a first-order kinetic (\ln

Table 4 Mean ionic composition at the beginning of the experiment in all mesocosms and in the control and treated mesocosms throughout the experiment

	CO ₃ ²⁻ meq L ⁻¹	HCO ₃ ⁻ meq L ⁻¹	SO ₄ ²⁻ meq L ⁻¹	Cl ⁻ meq L ⁻¹	NO ₃ ⁻ meq L ⁻¹	Ca ²⁺ meq L ⁻¹	Mg ²⁺ meq L ⁻¹	Na ⁺ meq L ⁻¹	K ⁺ meq L ⁻¹	∑ anions meq L ⁻¹	∑ cations meq L ⁻¹
Initial (<i>t</i> ₀)	2.40	11.60	1.80	11.00	0.11	0.13	1.80	25.20	0.60	26.90	27.70
Control (<i>t</i> ₁₋₅)	5.00	12.40	2.00	11.30	0.06	0.20	2.20	25.30	0.60	30.70	28.30
Treated (<i>t</i> ₁₋₅)	5.00	12.10	2.00	11.50	0.08	0.17	2.20	24.80	0.60	30.60	27.80

**Fig. 5** **a** Total phosphorus concentration in glyphosate enriched treatments against controls throughout the experimental period; negative linear relationship obtained between ln TP in enriched mesocosms and time. **b** Glyphosate dissipation from mesocosms' water and glyphosate residue fitted to a logarithmic function assuming first-order kinetics. Error bars represent +1 SE in histograms and ± 1 SD in regressions

glypho = $-0.165 \text{ day} + 1.8$; $P = 0.000001$) (Fig. 5b), glyphosate dissipation from treated mesocosms presented an estimate dissipation rate (k) of 0.165 day^{-1} (± 0.022 SD) with a half-life of 4.2 day. The glyphosate concentrations shortly (1 h) after the herbicide application were similar among mesocosms, presenting a mean value of 8.456 mg L^{-1} (± 0.686 SD). Higher differences in glyphosate concentration were observed among mesocosms at the end of the experiment, relative to initial values

(Fig. 5b). One of the five treated mesocosms (E3) was excluded from dissipation analysis due to its erratic behavior in glyphosate concentrations throughout the experiment.

Discussion

The present study demonstrated that there was a clear delay in the periphytic colonization of new substrata in large treated outdoor mesocosms, with limnological characteristics similar to those of shallow lakes of the Pampa plain. This delay could be attributed to a direct toxicological effect of Roundup[®]. Considering that periphyton is one of the most significant microbial communities as a base of food webs in shallow lakes (Vadeboncoeur and Steinman 2002), the consequences on the ecology of the system would be important. Although both treatments, with and without herbicide, exhibited a biomass increase, in control mesocosms the magnitude of the biomass accrual was higher than in those receiving Roundup[®], and this effect remained evident until the end of the lengthy experiment. Austin et al. (1991) showed an opposite behavior with an enhancement of AFDW and algal densities as a result of glyphosate (mediated by Vision[®] formulae) addition. These authors demonstrated the enhancement of soluble phosphorus concentration as a result of the degradation of glyphosate in oligotrophic streams. Thus, periphytic primary producers could develop higher biomass in such nutrient poor environments. Our mesocosms were always eutrophic and the differences in growth can be attributed to the toxicological effect of Roundup[®].

Despite the lack of significant differences between treatments, the trend to a decrease in primary production in treated mesocosms was clear and was consistent with the results of Goldsborough and Brown (1988). They found that the photosynthetic activity of periphyton decreased with an increasing amount of herbicide, and that the limiting concentration for this effect depended on the physical and chemical properties of the water bodies and other factors, including transport limitation in thick periphyton films and degradation of the herbicide by periphytic organisms as a phosphorus source. Consistently, in our

experiment, the major effect can be seen upon 8 days of colonization, when the periphyton films were thin and the amount of non-algal material was the lowest. It is important to point out that the toxicity is produced by the joint effect of both glyphosate and POEA, which is the surfactant of the commercial formulation Roundup® whose toxicity was shown to be higher than glyphosate (Struger et al. 2008).

Among the main algal groups, diatoms (Bacillariophyceae) appeared to be the most affected by the herbicide, with the lowest abundances in treated mesocosms. Despite differences among mesocosms and time, the more representative species of diatoms that were registered were the ubiquitous *Gomphonema parvulum*, *Achnanthes minutissima* and *Amphora veneta*. Taking into consideration that the dead diatoms immersed in the periphytic matrix presented higher numbers in Roundup® than in control mesocosms it is clear that the herbicide produced mortality and a decrease in the recruitment of new organisms. Cyanobacteria, on the other hand, emerged enhanced in number in treated mesocosms. These organisms, typical of extreme environments including herbicide stressed habitats, may resist glyphosate by different strategies. Besides the overproduction of EPSP synthase or the production of a glyphosate-tolerant enzyme (Powell et al. 1991) some cyanobacteria have the ability to degrade glyphosate and use it as a phosphorus source (Forlani et al. 2008; Lipok et al. 2007). Pérez et al. (2007) also observed higher proportion of periphytic cyanobacteria and registered a 40-fold increase in planktonic picocyanobacteria abundance as a result of Roundup® addition.

An important finding of this study is that, regardless the limnological type, the P content of the added glyphosate caused the increase of TP in all treated mesocosms. Pérez et al. (2007) also observed a TP increase after the addition of Roundup®, but in mesocosms with similar limnological properties. Considering that phosphorus represents 14% of glyphosate's molecular weight, the increased amount of TP in the first sampling, 3 days after glyphosate addition, accounted for 76% of the added P. Taking into account that glyphosate is fast dissipated from the water -we registered a half-life of 4.2 days similar to those reported in the literature-, three processes occur simultaneously: the incorporation of the herbicide in macrophytes and microorganisms such as phytoplankton and periphyton; glyphosate degradation by bacteria and fungi (Castro et al. 2007; Liu et al. 1991), and its immobilization upon contact with sediments, soils and clay minerals because of the formation of surface complexes with metal ions (Pessagno et al. 2005). In soils the most important metabolic pathway of glyphosate is the transformation into sarcosine and aminometilphosphonic acid (AMPA), which is further degraded to carbon dioxide (Giesy et al. 2000). Microbial degradation of AMPA has been reported to proceed at a slower rate than glyphosate breakdown, being

detected in samples much more frequently compared to glyphosate (Kolpin et al. 2006). Since AMPA contains the P moiety of the glyphosate, and considering that we measured a glyphosate dissipation rate four times faster than the dissipation rate of TP, we suggest that the metabolic pathway of glyphosate degradation is quantitatively larger in our experiment. However, the glyphosate adsorbed to particles has a longer half-life and will return to the water as the equilibrium reaction is slowly modified (Barja and dos Santos Afonso 2005) eventually resulting in a long term effect.

The ten outdoor mesocosms used resembled the limnological physiognomy of the surrounding shallow natural lakes. Within the Pampa plain a host of shallow lakes shows two main contrasting typologies: "clear" water lakes, with dense macrophyte stands sustaining luxuriant periphyton growth, and "turbid" ones in which dense phytoplankton assemblages replace the macrophyte-periphytic dominance or which have a high amount of inorganic suspended solids (Allende et al. 2009). Since the glyphosate half-life was no longer than 1 week it was assumed that no long term effect could be attained, and that after a year of recovery it would be safe to start a new experiment in the same mesocosms. However, most of the "turbid" mesocosms in the present experiment were those treated with glyphosate in the previous experiment and the mesocosms used as controls in the first experiment remained "clear" at present. Unexpectedly, we detected that a single application of glyphosate in 2005 shifted the mesocosms from a "clear" to a "turbid" state which remained until the next year. As was discussed above, the glyphosate may be adsorbed to sediments and a slow later desorption might produce a long term effect suppressing growth of the most sensitive groups and favoring the abilities to compete of the more resistant algae. This trend in long term effect was suggested by Holtby and Baillie (1989) who reported an enhancement of periphytic production as a response to increased levels of phosphorus produced by a unique application of Roundup® done 1 year before their experiment, carried out in natural streams.

Agriculture intensification occurred in the last decades within the Pampa plain (Mugni et al. 2005) and agrochemical consumption sharply increased. Quirós et al. (2002) suggested that most of the Pampean shallow lakes were in a "clear" water state at the beginning of this process and have now turned to a "turbid" water phase. Their work mainly discussed the effect of fertilizer applications, presenting evidence that nutrient loads into regional water bodies increased as a consequence of higher fertilizer applications, turning lakes from a "clear" to a "turbid" phase. Despite in Argentina the fertilizers are the main responsible to nutrient loading to water bodies due to the high amount used in agriculture (between 50 and

100 kg ha⁻¹), it has to be considered that the use of pesticides with phosphorus, such as glyphosate, increases even more the nutrient loading. The present study showed that a single glyphosate addition produced a long term shift in the water bodies' typology which is consistent with the regional trend suggested by Quirós et al. (2002).

The enrichment of the systems related to glyphosate addition was reported in the literature (Austin et al. 1991). The possibility of the acceleration of the eutrophication process and its consequences for natural environments are serious. In such situations, the whole ecology of the system turns to conditions where the physical and chemical properties of the water produce a decrease in biodiversity with the probable development of resistant species that might grow explosively. One of the most common and potentially toxic bloom forming cyanobacteria are *Microcystis aeruginosa*, usually detected in water bodies worldwide including in shallow lakes of the Pampean region (Izaguirre and Vinocur 1994). Forlani et al. (2008) have demonstrated that this species is capable of using glyphosate as a phosphorus source. Thus, these cyanobacteria are not only not affected adversely by glyphosate but their development is even enhanced by the herbicide, worsening the overall ecological condition of the shallow lakes near glyphosate-tolerant cultivation fields.

Aquatic ecosystems around the Pampean region of Argentina—more than 10,000 water bodies (Dukatz et al. 2006)—are at risk of being affected by the toxicological properties as well as the eutrophication potential of the glyphosate. In our study, the periphyton interacted with other communities and with the abiotic environment, enabling valid extrapolative inferences from our results to be made for natural aquatic systems. Based on the findings obtained in our work as well as those obtained in previous researches, it is clear that agricultural practices that involve the use of herbicides such as Roundup[®] affect non-target organisms and water quality, modifying the structure and functionality of freshwater ecosystems.

Acknowledgments We wish to thank José Bustingorry and Roberto Escaray for their field and laboratory assistance and to two anonymous reviewers for their useful comments on the manuscript. This work was supported by CONICET PIP 5614, Universidad Nacional de General San Martín grant S-05/19 and ANPCyT PICT 01104.

References

- Achiorno CL, de Villalobos C, Ferrari L (2008) Toxicity of the herbicide glyphosate to *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha). *Chemosphere* 71:1816–1822. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.02.001
- Allende L, Tell G, Zagarese H, Torremorell A, Pérez G, Bustingorry J, Escaray R, Izaguirre I (2009) Phytoplankton and primary production in clear-vegetated, inorganic-turbid, and algal-turbid shallow lakes from the pampa plain (Argentina). *Hydrobiologia* 624:45–60. doi:10.1007/s10750-008-9665-9
- American Public Health Association (2005) Standard methods for the examination of water and wastewaters, 21st edn. Centennial Edition. APHA, American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington, DC
- Amrhein N, Deus B, Gehrke P, Steinrücken HC (1980) The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. *Plant Physiol* 66:830–834. doi:10.1104/pp.66.5.830
- Asselborn VM, Zalocar de Domitrovic Y (1998) Efectos del herbicida glifosato sobre el crecimiento del alga verde *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta). *Rev Bras Toxicol* 11:61–65
- Austin AP, Harris GE, Lucey WP (1991) Impact of an organophosphate herbicide (Glyphosate[®]) on periphyton communities developed in experimental streams. *Bull Environ Contam Toxicol* 47:29–35. doi:10.1007/BF01689449
- Barja BC, dos Santos Afonso M (2005) Aminomethylphosphonic Acid and Glyphosate adsorption onto Goethite: A comparative Study. *Environ Sci Technol* 39:585–592. doi:10.1021/es035055q
- CASAFE (2009). Informe de Mercado Argentino de Fitosanitarios, año 2007. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. 61 pp
- Castro JV Jr, Peralba MCR, Ayub MAZ (2007) Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor. *J Environ Sci Health, Part B* 42:883–886. doi:10.1080/03601230701623290
- Cavalcante DGSM, Martínez CBR, Sofia SH (2008) Genotoxic effects of Roundup[®] on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 655:41–46. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.06.010
- Costa MJ, Monteiro DA, Oliveira-Neto AL, Rantin FT, Kalinin AL (2008) Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original[®]. *Ecotoxicology* 17:153–163. doi:10.1007/s10646-007-0178-5
- Dukatz F, Ferrari R, Canziani G (2006) Evaluación de sistemas lacunares bonaerenses mediante imágenes Landsat TM. *Biol Acuát* 22:95–101
- Edwards WM, Triplett GB Jr, Kramer RM (1980) A watershed study of glyphosate transport in runoff. *J Environ Qual* 9:661–665
- Feng JC, Thompson DG, Reynolds P (1990) Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. I. Aquatic residues and off-target deposit assessment. *J Agric Food Chem* 38:1110–1118. doi:10.1021/jf00094a045
- Forlani G, Pavan M, Gramek M, Kafarski P, Lipok J (2008) Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. *Plant Cell Physiol* 49:443–456. doi:10.1093/pcp/pcn021
- Giesy JP, Dobson S, Solomon KR (2000) Ecotoxicological risk assessment for Roundup[®] herbicide. *Rev Environ Contam Toxicol* 167:35–120
- Goldsborough LG, Beck AE (1989) Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds. *Arch Environ Contam Toxicol* 18:537–544. doi:10.1007/BF01055020
- Goldsborough LG, Brown DJ (1988) Effect of glyphosate (Roundup[®] formulation) on periphytic algal photosynthesis. *Bull Environ Contam Toxicol* 41:253–260. doi:10.1007/BF01705439
- Henry CJ, Higgins KF, Buhl KJ (1994) Acute toxicity and hazard assessment of Rodeo[®], X-77 Spreader[®], and Chem-Trol[®] to aquatic invertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol* 27:392–399. doi:10.1007/BF00213176
- Holtby LB, Baillie SG (1989) Effects of the herbicide Roundup (glyphosate) on periphyton in carnation creek, British Columbia. In: Proceedings of the carnation creek herbicide workshop, March 1989, pp 224–231

- Izaguirre I, Vinocur A (1994) Typology of shallow lakes of the Salado River basin (Argentina), based on phytoplankton communities. *Hydrobiologia* 277:49–62. doi:[10.1007/BF00023985](https://doi.org/10.1007/BF00023985)
- James C (2007) Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2007. ISAAA Brief No. 37. ISAAA, Ithaca, NY
- Kolpin DW, Thurman EM, Lee EA, Meyer MT, Furlong ET, Glassmeyer ST (2006) Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Sci Total Environ* 354:191–197. doi:[10.1016/j.scitotenv.2005.01.028](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.028)
- Langiano VC, Martinez CBR (2008) Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol, Part C* 147:222–231. doi:[10.1016/j.cbpc.2007.09.009](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.009)
- Laurion I, Lami A, Sommaruga R (2002) Distribution of mycosporine-like amino acids and photoprotective carotenoids among freshwater phytoplankton assemblages. *Aquat Microb Ecol* 26:283–294. doi:[10.3354/ame026283](https://doi.org/10.3354/ame026283)
- Liboriussen L, Jeppesen E (2003) Temporal dynamics in epipelagic, pelagic and epiphytic algal production in a clear and a turbid shallow lake. *Freshw Biol* 48:418–431. doi:[10.1046/j.1365-2427.2003.01018.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01018.x)
- Lipok J, Owsiak T, Młynarz P, Forlani G, Kafarski P (2007) Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates—the ability of *Spirulina* spp. to degrade glyphosate. *Enzyme Microb Technol* 41:286–291. doi:[10.1016/j.enzmictec.2007.02.004](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.004)
- Liu CM, McLean PA, Sookdeo CC, Cannon FC (1991) Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Appl Environ Microbiol* 57:1799–1804. doi:[0099-2240/91/061799-06\\$02.00/0](https://doi.org/10.1009/2240/91/061799-06$02.00/0)
- Mann RM, Bidwell JR (1999) The toxicity of glyphosate formulations to four species of Southwestern Australian frogs. *Arch Environ Contam Toxicol* 36:193–199. doi:[10.1007/s002449900460](https://doi.org/10.1007/s002449900460)
- Mantoura RFC, Llewellyn CA (1983) The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 151:297–314. doi:[10.1016/S0003-2670\(00\)80092-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)80092-6)
- Miles CJ, Wallace LR, Moye HA (1986) Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl) phosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic labeling with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *J Assoc Off Anal Chem* 69:458–461
- Mugni H, Jergentz S, Schulz R, Maine A, Bonetto C (2005) Phosphate and nitrogen compounds in streams of Pampean Plain areas under intensive cultivation (Buenos Aires, Argentina). In: Serrano H, Golterman HL (eds) *Phosphates in sediments*. Backhuys Publishers, The Netherlands, pp 163–170
- Pérez GL, Torremorell A, Mugni H, Rodríguez P, Vera MS, Do Nascimento M, Allende L, Bustingorry J, Escaray R, Ferraro M, Izaguirre I, Pizarro H, Bonetto C, Morris DP, Zagarese H (2007) Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecol Appl* 17:2310–2322. doi:[10.1890/07-0499.1](https://doi.org/10.1890/07-0499.1)
- Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE (2008) Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ Pollut* 156:61–66. doi:[10.1016/j.envpol.2008.01.015](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015)
- Pessagno RC, Dos Santos Afonso M, Torres Sanchez RM (2005) N-(Phosphonomethyl)glycine interactions with soils. *J Argent Chem Soc* 93:97–108
- Powell HA, Kerby NW, Rowell P (1991) Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. *New Phytol* 119:421–426. doi:[10.1111/j.1469-8137.1991.tb00042.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00042.x)
- Quirós R, Drago E (1999) The environmental state of Argentinean lakes: an overview. *Lakes Reserv Res Manag* 4:55–64. doi:[10.1046/j.1440-1770.1999.00076.x](https://doi.org/10.1046/j.1440-1770.1999.00076.x)
- Quirós R, Rosso JJ, Rennella A, Sosnovsky A, Boveri M (2002) Análisis del estado trófico de las lagunas pampeanas (Argentina). *Interciencia* 27:584–591
- Relyea RA (2004) Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environ Toxicol Chem* 23:1737–1742. doi:[10.1897/03-493](https://doi.org/10.1897/03-493)
- Relyea RA (2005a) The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol Appl* 15:618–627. doi:[10.1890/03-5342](https://doi.org/10.1890/03-5342)
- Relyea RA (2005b) The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecol Appl* 15:1118–1124. doi:[10.1890/04-1291](https://doi.org/10.1890/04-1291)
- Relyea RA (2006) The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol Appl* 16:2027–2034. doi:[10.1890/04-1291](https://doi.org/10.1890/04-1291)
- Relyea RA, Schoeppner NM, Hoverman JT (2005) Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecol Appl* 15:1125–1134. doi:[10.1890/04-0559](https://doi.org/10.1890/04-0559)
- Sabater S, Admiral W (2005) Periphyton as biological indicators in managed aquatic ecosystems. In: Azim ME, Verdegem MCJ, van Dam AA, Beveridge MCM (eds) *Periphyton. Ecology, exploitation and management*. CABI Publishing, London, pp 159–178
- Sáenz ME, Di Marzio WD, Alberdi JL, Tortorelli MC (1997) Effects of technical grade and a commercial formulation of glyphosate on algal population growth. *Bull Environ Contam Toxicol* 59:638–644. doi:[10.1007/s001289900527](https://doi.org/10.1007/s001289900527)
- Salisbury FB, Ross CW (1994) *Fisiología vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica, México, DF
- Schaffer JD, Sebetich MJ (2004) Effects of aquatic herbicides on primary productivity of phytoplankton in the laboratory. *Bull Environ Contam Toxicol* 72:1032–1037. doi:[10.1007/s00128-004-0347-7](https://doi.org/10.1007/s00128-004-0347-7)
- Sobrero C, Martin ML, Ronco A (2007) Fitotoxicidad del herbicida Roundup® Max sobre la especie no blanco *Lemna gibba* en estudios de campo y laboratorio. *Hidrobiológica* 17:31–39
- Steeman-Nielsen E (1952) The use of radioactive carbon (¹⁴C) for measuring organic production in the sea. *J Cons Int l'Explor Mer* 18:117–140
- Struger J, Thompson D, Staznik B, Martin P, McDaniel T, Marvin Ch (2008) Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ontario. *Bull Environ Contam Toxicol* 80:378–384. doi:[10.1007/s00128-008-9373-1](https://doi.org/10.1007/s00128-008-9373-1)
- Stumm W, Morgan JJ (1996) *Aquatic chemistry. Chemical equilibria and rates in natural waters*. Wiley, New York
- Trigo EJ, Cap EJ (2006) Diez años de cultivos transgénicos en la agricultura Argentina. *ArgenBio, Buenos Aires* 53 pp
- Tsui MTK, Wang WX, Chu LM (2005) Influence of glyphosate and its formulation (Roundup®) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Pollut* 138:59–68. doi:[10.1016/j.envpol.2005.02.018](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.02.018)
- Utermöhl M (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *MIH Verh Int Ver Limnol* 9:1–38
- Vadeboncoeur Y, Steinman A (2002) Periphyton function in lake ecosystems. *Sci World* 2:1449–1468. doi:[10.1100/tsw.2002.294](https://doi.org/10.1100/tsw.2002.294)
- Venrick EL (1978) How many cells to count? In: Sournia A (ed) *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris, pp 167–180