



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Resistencia y recuperación de comunidades perifíticas de  
agua dulce luego de la exposición a glifosato**

**Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Luciana Micaela Salgueiro**

Directora: Dra. María Solange Vera

Lugar de trabajo: Laboratorio de Limnología - Departamento de  
Ecología, Genética y Evolución (FCEyN - UBA)

Diciembre de 2024

## ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
Agradecimientos	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Agricultura industrial en Argentina	6
1.2. Glifosato en ecosistemas agrícolas y acuáticos	7
1.3. Efectos del glifosato en organismos y comunidades acuáticas	11
1.4. El perifiton como bioindicador y objeto de estudio	12
1.5. Perifiton: estudios ecotoxicológicos	13
1.6. Perifiton: evaluación de la resistencia y recuperación	16
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Colonización perifítica al aire libre	21
3.2. Microcosmos en laboratorio	23
3.3. Tratamientos y períodos: exposición y recuperación	23
3.4. Determinaciones cuantitativas	25
3.4. Determinaciones cuantitativas	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Variables del agua del tanque experimental	29
4.2. Variables del agua de los microcosmos	29
4.3. Variables del perifiton en los microcosmos	35
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	50
5.1. Periodo de exposición	50
5.2. Periodo de recuperación	55
5.3. Conclusión	58
5.4. Consideraciones para un próximo experimento de resistencia y recuperación perifítica	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO I	75

## RESUMEN

Los herbicidas a base de glifosato son los más utilizados en todo el mundo. Debido a su acción no selectiva y de amplio espectro, se espera que estos provoquen efectos perjudiciales tanto en organismos blanco como no blanco. El glifosato es encontrado frecuentemente en cuerpos de agua dulce cercanos a los campos de cultivo donde se lo aplica. Sus efectos sobre distintas comunidades y ecosistemas acuáticos han sido ampliamente estudiados, sin embargo, se conoce muy poco sobre el potencial de recuperación luego de la exposición al glifosato. Las comunidades acuáticas microbianas, como el perifiton, son muy importantes como indicadoras de recuperación ecosistémica ya que son ubicuas en diferentes ecosistemas, responden rápidamente a los cambios ambientales, y proveen muchas funciones y servicios ecosistémicos mediante su diversidad funcional y estructural. En esta tesis estudiamos, durante 8 días, los efectos de la exposición a la sal mono isopropilamina de glifosato (0,4 mg/L) en perifiton de agua dulce con distinto tiempo de colonización (1 y 2 meses de desarrollo) sobre sustratos artificiales, en microcosmos de laboratorio. Evaluamos también el potencial de recuperación de las comunidades perifíticas luego de ser translocadas a un medio libre de herbicida, durante 21 días. Según nuestros resultados ambas comunidades son afectadas por el glifosato, al provocar una alteración de las variables del perifiton. Por otro lado, ambas comunidades logran recuperar sus características a los valores control, siendo la recuperación más rápida en la comunidad con menor tiempo de desarrollo. Considerando la importante cantidad de glifosato que se utiliza en todo el mundo y su riesgo potencial para los ecosistemas acuáticos, es fundamental evaluar sus efectos sobre las poblaciones y las comunidades inmersas en ellos, incluida su recuperación como indicador de salud ecosistémica.

## **ABSTRACT**

Glyphosate-based herbicides are the most widely used worldwide. Due to their non-selective and broad-spectrum action, these herbicides are expected to cause harmful effects on both target and non-target organisms. Glyphosate is frequently found in freshwater bodies near agricultural fields where it is applied. Although the effects of glyphosate on various aquatic communities and ecosystems have been extensively studied, little is known about the potential for recovery following glyphosate exposure. Microbial aquatic communities, such as periphyton, are crucial as indicators of ecosystem recovery, as they are ubiquitous across different ecosystems, respond rapidly to environmental changes, and provide numerous ecosystem functions and services through their functional and structural diversity. In this thesis, we studied the effects of exposure to the mono-isopropylamine salt of glyphosate (0,4 mg/L) on freshwater periphyton with different colonization times (1 and 2 months of development) on artificial substrates, in laboratory microcosms over 8 days. We also evaluated the recovery potential of periphytic communities after being transferred to a herbicide-free medium for 21 days. Our results show that both communities are affected by glyphosate, which disrupts the structural variables of the periphyton. Furthermore, both communities managed to recover their characteristics to control values, with a faster recovery observed in the less developed community. Given the substantial amount of glyphosate used worldwide and its potential risk to aquatic ecosystems, it is essential to assess its effects on populations and communities within these ecosystems, including their recovery as an indicator of ecosystem health.

## AGRADECIMIENTOS

*No permitir que se nos desperdicie la gracia de los pequeños momentos de libertad que podemos gozar: una mesa compartida con gente que queremos, unas criaturas a las que demos amparo, una caminata entre los árboles, la gratitud de un abrazo. Un acto de arrojo como saltar de una casa en llamas. Éstos no son hechos racionales, pero no es importante que lo sean, nos salvaremos por los afectos.*

Ernesto Sabato, *La resistencia*.

Esta tesis representa el cierre de una etapa que me costó muchísimo terminar. Algún día quizás entienda el porqué. Quiero dedicársela a todas aquellas personas que confiaron en que podía hacerlo, y que a su manera me acompañaron con palabras de aliento, paciencia, ternura, cosas ricas y deadlines desafiantes. Sola no hubiera podido, y tampoco sé si hubiera tenido sentido. A todas, gracias.

A Solange, por tenerme infinita paciencia y por hacerme sentir tan a gusto durante el transcurso del experimento y en el laboratorio. Aprendí mucho y me sentí muy contenida, en especial cuando tenía dudas. Gracias también por repetirme las cosas las veces que hicieron falta, por adaptarte a mis tiempos y por motivarme hasta el último día.

A Haydée, por presentarme la oportunidad de hacer la tesis en su laboratorio, por ser la tutora de mi plan de estudios y una profesora verdaderamente inspiradora.

A la FCEN UBA, que fue mi segunda casa por casi una década y me llevó a conocer personas espectaculares de las cuales aprendí mucho más que contenido curricular. A la universidad pública, gratuita y de calidad, por brindarme herramientas muy valiosas para poner en práctica el pensamiento crítico y por acercarme a gente sumamente interesante, inspiradora y curiosa que hoy tengo el honor de llamar colega y/o amiga.

A los financiamientos que hicieron posible este trabajo: PICT 2020-03560 y UBACYT 2023-20020220400018BA.

A Vi y a Omi, por estar siempre. Por respetar mis tiempos, hasta los imposibles de entender. Por las vacaciones en familia, por los libros, el buceo, la naturaleza, el inglés, la curiosidad y la ciencia en el día a día. Por haberme dado tanta libertad y por hacerme sentir capaz de lograr lo que me propusiera.

Al Dori, por la honestidad brutal diaria y por demostrarme todo el tiempo lo genial que es tener una hermanita absolutamente inspiradora. Al Fiquito y a Tito, que me regalaron las

miradas más dulces, los mimitos más suaves y los paseos floridos más divertidos. Lxs amo a lxs tres de una manera muy especial, gracias.

A mis abuelxs, que seguramente estarían orgullosxs de sumar otra universitaria a la familia.

A Gigi, por acompañarme desde hace años con inmensa ternura.

A Lochi y a Cane, por haber sido mis mejores amigas en la tierna infancia y juventud, y por seguir acá. A P, por el compañerismo sincero de tantos años.

A Belu, por ser todo lo que me hizo falta al inicio de esta aventura y por seguir siendo una hermana compinche en mucho más que ladridos de ciencia.

A Sofi L y a Vicky, por las meriendas y charlas terapéuticas. A Mari, por tener siempre alguna oferta laboral, chismecito o algo dulcecito para compartirnos.

A Sofi O, mi compañera del final de la carrera pero mi hermana elegida para ayudarme a conocerme en este momento de la vida.

A Cata, por nuestra amistad transformadora y por ser de mis imprescindibles.

A Nico, por la sinergia que encontramos en compartir y reflexionar juntxs.

A Fer, por la confianza movilizante y por haberme acercado tanto a la persona que soy hoy.

A mi querido equipo de Xplora, que más que grupo de trabajo es un grupo de amigxs a lxs que admiro y quiero mucho. Por las tremendas herramientas que me da ser parte de un equipo tan curioso y ambicioso. Gracias por tantas xperiencias increíbles compartidas.

A mis amigxs de la vida, que le van sumando a mi existencia anécdotas interesantes.

A mis compas de Refugio de Glaciares que me conocieron en esta última etapa y me acompañaron con mates, cafés y charlas inspiradoras. Al paisaje patagónico que me abraza en este cierre, haciéndolo sentir completamente épico. A todxs mis caminantes de Chaltén que me desearon éxitos y una linda recibida.

A las muchas personas que, alguna vez, incluso sin darse cuenta, me inspiraron a querer ser como ellas, en el aula y en la vida.

Y, finalmente, a la Luciana chiquitita que gustaba mucho de la naturaleza y que, al curiosear algo nuevo, iba corriendo a compartirlo con lxs demás. Gracias a esa niña por seguir siendo parte de mí.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Agricultura industrial en Argentina

En el último siglo, los avances en ciencia y tecnología han transformado radicalmente la extracción y el uso de recursos naturales, superando nuestra capacidad de predecir sus efectos a largo plazo en los ecosistemas (Twardowska 2004). Los ecosistemas acuáticos son particularmente vulnerables a las perturbaciones antropogénicas, como la exposición a grandes cantidades de herbicidas (Gustavsson et al. 2017, Pérez et al. 2017), que pueden afectar tanto la estructura como el funcionamiento de las comunidades naturales (Rohr y Crumrine 2005, Macchi et al. 2018). La agricultura intensiva es una de las principales fuentes de esos contaminantes, que frecuentemente terminan en cuerpos de agua cercanos a los campos de cultivo, amenazando a las comunidades microbianas que allí habitan (Van Bruggen et al. 2018, Lutri et al. 2020).

La agricultura es una de las actividades humanas más antiguas y ha ido evolucionando notablemente; especialmente con la aparición de la agricultura industrial en los años setenta, marcada por la Revolución Verde (RV). El enfoque de la RV se basa en monocultivos, en la mecanización de las prácticas agrícolas y en el uso masivo de agroquímicos (fertilizantes, herbicidas, insecticidas, etc). Esta nueva forma de producir impulsó tanto el crecimiento poblacional como la contaminación ambiental (Massard-Guilbaud y Mathis 2017). Y si bien logró aumentar los rendimientos, también exacerbó la pérdida de hábitats a nivel global debido a la expansión de tierras agrícolas (Tilman et al. 2001) hacia tierras que originalmente no eran aptas para cultivo, como humedales, laderas y bosques (Paruelo et al. 2010).

El éxito de la RV se atribuye en parte al desarrollo de semillas genéticamente modificadas (GM). Estas semillas, diseñadas para resistir enfermedades, plagas o herbicidas específicos, requieren el uso constante de agroquímicos (Pimentel 1996). Esta dependencia les confiere una ventaja competitiva en el contexto agrícola, resultando en mayores rendimientos y una producción más estable. Sin embargo, este enfoque también ha generado preocupaciones significativas en términos de salud pública y efectos ambientales debido al uso desmedido de estos químicos (Bull 1982, El-Sebae 1989, Pimentel 1989, WHO/UNEP 1989). Desafortunadamente, los estudios para predecir los impactos futuros de la biotecnología GM y sus agroquímicos asociados no han seguido el mismo ritmo que la extraordinaria expansión que han tenido sus cultivos (FAO 2021).

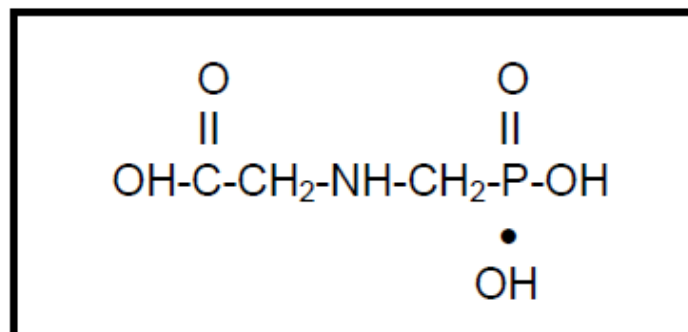
En Argentina, la introducción del paquete tecnológico de la agricultura industrial (semillas

transgénicas y sus agroquímicos asociados) comenzó a fines de la década de los noventa con la aprobación del cultivo de soja “Roundup Ready®” (RR) resistente al herbicida glifosato. Esta fue la primera semilla genéticamente modificada (Trigo 2016), producida en 1996 por Monsanto®, una empresa adquirida por Bayer® en 2018. Esta variedad de soja fue diseñada para tolerar aplicaciones de glifosato, permitiendo a los agricultores controlar las malezas sin dañar los cultivos de soja, lo que generó una liberación significativa de este herbicida al ambiente (Sáenz y Di Marzio 2009). Desde entonces, se han aprobado decenas de variedades transgénicas, siendo las más comunes la soja, el maíz y el algodón, con variantes tolerantes a herbicidas o resistentes a insectos (Castro Berman et al. 2018). Actualmente, Argentina es uno de los principales consumidores de glifosato en el mundo, situándose como el tercer país con mayor uso de este herbicida, después de Estados Unidos y Brasil (FAOSTAT 2023).

## 1.2. Glifosato en ecosistemas agrícolas y acuáticos

El glifosato (N- (fosfometil) glicina) es el herbicida más ampliamente utilizado a nivel mundial (Richmond 2018). Suele utilizarse para el control de herbáceas aplicándose directamente sobre las plantas una vez que éstas emergen del suelo (post-emergente), se disemina a través de su floema (sistémico), y puede actuar sobre varias plantas, incluida la especie que se quiere cultivar (amplio espectro no selectivo). Una vez aplicado, las especies no deseadas para el cultivo mueren, pero el cultivo transgénico resistente al glifosato sobrevive (Lapitz et al. 2004).

Su fórmula molecular es  $C_3H_8NO_5P$  (Gimsing y dos Santos Afonso 2005), y su fórmula estructural (Thomson 1993):

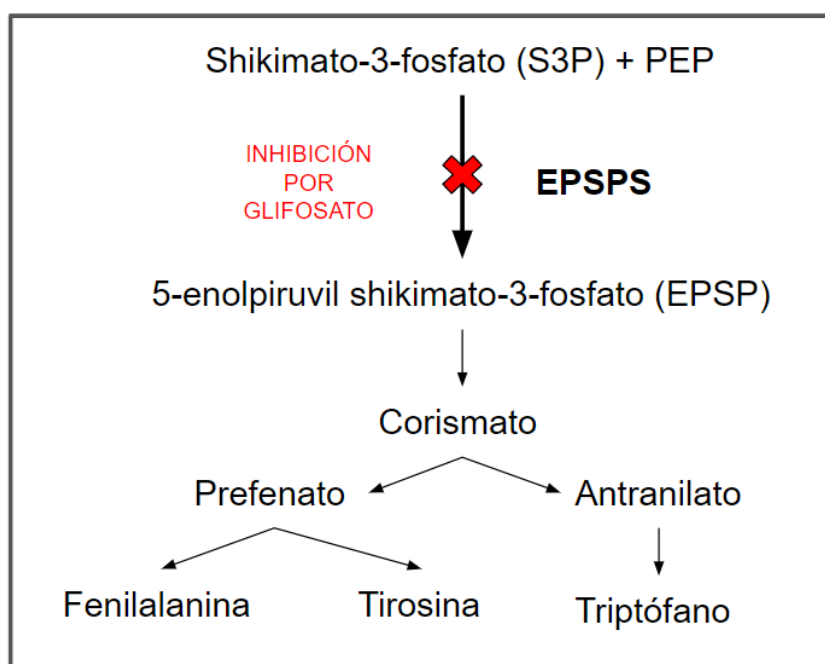


En 1970, el químico John Franz descubrió la actividad herbicida del glifosato. Cuatro años después, Monsanto lanzó al mercado el primer producto que contenía glifosato, conocido



como Roundup®. Este herbicida se popularizó en años posteriores, especialmente para los cultivos de soja, maíz y algodón transgénicos (Benbrook 2016).

Su principal mecanismo de acción (*Figura 1.1*) en plantas y algunos microorganismos (algas, hongos y bacterias) consiste en inhibir la actividad de la 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una enzima necesaria para la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales (fenilalanina, tirosina y triptófano). Este mecanismo de acción, 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), precursor del corismato. El corismato es requerido para la biosíntesis de gran cantidad de compuestos aromáticos. Por lo tanto, el glifosato, en última instancia, inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos, reduce la síntesis de proteínas y otras moléculas que los requieren como precursores (Salisbury y Ross 1994) y provoca eventualmente muerte celular prematura (Lydon y Duke 1988, Pérez et al. 2007).



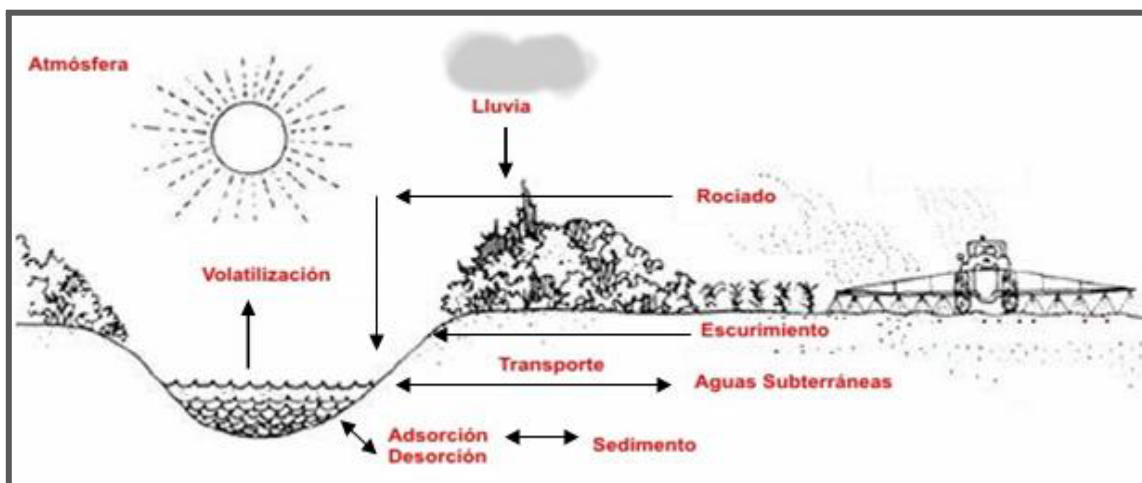
**Figura 1.1.** Esquema del mecanismo de acción del glifosato en plantas. El glifosato actúa como un inhibidor competitivo ocupando el sitio del PEP (fosfoenolpiruvato) en el complejo enzimático 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Adaptado de Giesy et al. (2000).

El glifosato se usa comúnmente en forma de sal de isopropilamina (Peruzzo et al. 2008).

Este compuesto es muy soluble en agua y se adhiere firmemente a las partículas del suelo, lo que hace que su acción herbicida sea efectiva únicamente cuando se aplica sobre las hojas. En los formulados comerciales de glifosato suelen utilizarse surfactantes para reducir la tensión superficial entre la cutícula de las hojas y las gotas del herbicida, facilitando su dispersión y absorción en las plantas rociadas (Giesy et al. 2000). Estos aditivos en general se consideran como inertes en las formulaciones. Sin embargo, pueden afectar la estructura del suelo (Battaglin et al. 2014) y algunos, como la polioxietil amina (POEA), producen toxicidad en distintos organismos y comunidades (Tsui y Chu 2003, Cedergreen y Streibig 2005, Klátyik et al. 2017).

La composición química de los productos comerciales en general no está completa ni claramente especificada por el fabricante, lo cual dificulta conocer su verdadero impacto ambiental, que puede no ser inocuo. A modo de ejemplo, Gonzalez et al. (2019) estudiaron la respuesta del perifiton de agua dulce al glifosato grado técnico y distintos formulados comerciales y concluyeron que los aditivos en los formulados Roundup Max® y Glifosato II Atanor® pueden intensificar los efectos negativos del herbicida sobre esta comunidad.

Se han detectado glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA, su principal metabolito) en el suelo, aire y agua de zonas donde no fueron directamente aplicados (Benbrook 2016). El destino del glifosato en el ambiente (*Figura 1.2*) depende de los métodos de aplicación y las condiciones geográficas y climáticas de cada región (Villamar-Ayala et al. 2019).



**Figura 1.2.** Posibles caminos del glifosato desde campos de cultivo hacia cuerpos de agua.

Aunque la mayor parte del herbicida penetra en los tejidos vegetales luego de ser aplicado sobre los cultivos, también puede ser arrastrado por la lluvia o permanecer en los tejidos en

descomposición de las plantas rociadas (CNIA-CONICET 2009). Así también, los microorganismos descomponedores del suelo degradan al glifosato y lo transforman principalmente en AMPA. Este último eventualmente se degrada en fosfato inorgánico, amonio y dióxido de carbono (Borggaard y Gimsing 2008).

La movilidad del herbicida a través del suelo depende de su estructura y del tipo de labranza (Lupi et al. 2015, Okada et al. 2016, Soracco et al. 2018). Se ha estimado que la vida media del glifosato en el suelo varía de 2 a 215 días y la del AMPA de 60 a 240 días (Battaglin et al. 2014). La variabilidad en la vida media podría deberse a la variabilidad en la actividad microbiana y al grado de adsorción en el suelo entre los distintos sitios estudiados (Coupe et al. 2012).

Las zonas agrícolas, frecuentemente asociadas a humedales, son las regiones que mayor probabilidad tienen de contaminar los ecosistemas acuáticos (Pérez et al. 2017), ya que los herbicidas pueden ser transportados desde los campos de cultivo a los ecosistemas acuáticos, por el viento (Sáenz y Di Marzio 2009, Chang et al. 2011), el escurrimiento de partículas del suelo (Bowmer 1982) o el lavado de equipos de fumigación (Major et al. 2003, Vera et al. 2010).

En los sistemas acuáticos, el glifosato puede sufrir varios procesos en simultáneo: ser incorporado por macrófitas y microorganismos, ser degradado por bacterias y hongos, adsorberse a sedimentos (Vera et al. 2010) o ser transportado por la corriente (Tsui y Chu 2008). En el agua, la vida media del glifosato es de 2 a 140 días, con un promedio de aproximadamente 40 días, comparable a la vida media del AMPA (Coupe et al. 2012).

A pesar de su vida media relativamente corta en el agua, se ha detectado glifosato en muchos sistemas lóticos, de regiones agrícolas y urbanas (Peruzzo et al. 2008, Pesce et al. 2009, Ronco et al. 2016), y también lénticos (Castro Berman et al. 2018). Ronco et al. (2008) estudiaron arroyos del noroeste de la provincia de Buenos Aires hallando concentraciones de glifosato generalmente menores a 1 mg/L en muestras de la cuenca del Río Arrecifes pero, entre 1,8 y 10,9 mg/L en el Arroyo Pescado. Ronco et al. (2016) estudiaron el curso principal del Río Paraná y sus principales afluentes, hallando una concentración media de glifosato de 0,006 mg/L. Peruzzo et al. (2008) detectaron concentraciones de glifosato de entre 0,1 y 0,7 mg/L en muestras de agua de arroyos del sistema Pergamino-Arrecifes, al norte de la provincia de Buenos Aires. Castro Berman et al. (2018) estudiaron el contenido de glifosato y AMPA en muestras de agua de lagos poco profundos de la región pampeana de la provincia de Buenos Aires, hallando una concentración media de glifosato de 0,002 mg/L y 0,0008 mg/L de AMPA. En la provincia de

Entre Ríos, fueron analizados distintos cursos de agua y se hallaron concentraciones de glifosato superiores a 73 mg/L y de hasta 105 mg/L en uno de los sitios de muestreo (Sasal et al. 2017). Esta última es, hasta la fecha, la mayor concentración de glifosato detectada mundialmente en sistemas de agua dulce (Brovini et al. 2021).

En varios países se han establecido concentraciones máximas permitidas de glifosato en agua. En Argentina, la Subsecretaría de Recursos Hídricos estableció, en 2003, que la concentración de glifosato como sal isopropilamina en fuentes de agua para consumo humano no debe superar los 0,3 mg/L. El Código Alimentario Argentino, en cambio, no informa sobre concentraciones máximas permitidas de glifosato en agua potable (Sasal et al. 2017).

### 1.3. Efectos del glifosato en organismos y comunidades acuáticas

En los ecosistemas acuáticos, el glifosato puede reducir la calidad de los mismos, afectando la biodiversidad, la estructura de las comunidades y de su red trófica, los patrones de flujo de energía y el ciclo de nutrientes, y la estabilidad y resiliencia del ecosistema (Pérez et al. 2011). Los efectos directos e indirectos de la toxicidad de herbicidas a base de glifosato han sido investigados en diversos organismos, como algas y cianobacterias (Cedergreen y Streibig 2005, Saenz y Di Marzio 2009, Lipok et al. 2010, Iummato et al. 2019), en bacterias, protozoos e invertebrados (Tsui y Chu 2003), macrófitas (Sesin et al. 2020), peces (Gluszczak et al. 2007, Cavalcante et al. 2008), anfibios (Relyea y Jones 2009, Bach et al. 2016) y aves acuáticas (Oliveira et al. 2007). Por otro lado, tanto el glifosato como los surfactantes de las formulaciones pueden aportar fósforo a los cuerpos de agua, contribuyendo así a la eutrofización de los mismos (Vera et al. 2012, Annett et al. 2014).

Las comunidades microbianas, esenciales en la producción primaria, el ciclo de nutrientes y procesamiento de la materia orgánica, al verse afectadas por el glifosato, pueden inducir efectos bottom-up o top-down en las redes tróficas (Schäfer et al. 2011). Según Rohr et al. (2006) estos efectos son menores cuanto mayor es la diversidad específica y las interacciones entre especies del ecosistema. Las comunidades fitoplanctónicas son especialmente vulnerables a formulados como Roundup®, ya que se ven afectadas aún a bajas concentraciones (Lipok et al. 2010), y pueden ver disminuidas sus tasas fotosintética y de crecimiento (Van Bruggen et al. 2018). Sin embargo, existen organismos no sensibles al herbicida (Székács y Darvas 2012) o que pueden beneficiarse del mismo, como ciertas cianobacterias que generan estrategias alternativas mediante la sobreexpresión de la

EPSPS o la producción de una enzima alternativa tolerante al glifosato (Powell et al. 1991, 1992, Forlani et al. 2008, 2015).

#### 1.4. El perifiton como bioindicador y objeto de estudio

Los bioindicadores son organismos que resumen la “historia” toxicológica de un lugar, revelando la complejidad del sitio afectado mediante cambios a nivel individual, poblacional o comunitario (Sabater et al. 2007). La utilización de algas como indicadores ecotoxicológicos tiene sus orígenes en el análisis de la respuesta de cultivos de algas. Sin embargo, la ecotoxicología de comunidades integra las respuestas de numerosas poblaciones y sus interacciones, permitiendo predecir los efectos de la exposición a tóxicos en los sistemas naturales (Källqvist et al. 1994).

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 (Wetzel 1983). Esta comunidad es ideal para su análisis en función de procesos contaminantes. Al tener hábito sésil no pueden evadir la polución, resumiendo las condiciones ambientales de un sitio determinado; sus cortos ciclos de vida permiten una rápida respuesta ante contaminantes; y sus comunidades compactas pueden ser muestreadas fácilmente a partir de unos pocos centímetros de sustrato (Lowe y Pan 1996). La fracción autotrófica del perifiton es fundamental en los procesos físicos, químicos y biológicos del cuerpo de agua, actuando como productores primarios y componentes base de la trama trófica (Goldsborough y Robinson 1996). Estos organismos responden y se recuperan rápidamente del estrés ambiental (Steinman y McIntire 1990, Gustavson et al. 2003).

El perifiton es uno de los mayores productores de las zonas litorales y ribereñas, junto con el fitoplancton y las macrófitas (Loeb et al. 1983), pudiendo ser su producción un 77% mayor que la del fitoplancton en lagos poco profundos de aguas claras (Liboriussen y Jeppesen 2003). Además de contribuir a la formación del sedimento, estabilizar el sustrato y reducir la erosión (Goldsborough y Robinson 1996), el perifiton puede favorecer el tratamiento del agua y la detoxificación y biodegradación de agentes contaminantes (Akbari et al. 2016).

Las comunidades perifíticas están inmovilizadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), compuesta principalmente por agua (en un 97%) y polisacáridos (Mora-Gómez et al. 2016). Esta matriz es un sistema dinámico que le confiere estructura y

morfología a la comunidad (Klátyik et al. 2017). A su vez, regula la adhesión al sustrato y protege a los microorganismos de depredadores, contaminantes y disturbios (Gustavson et al. 2003, Mora-Gómez et al. 2016). También captura nutrientes del agua y retiene enzimas extracelulares (Leff et al. 2016).

En general, en la experimentación con perifiton se utilizan sustratos artificiales como portaobjetos de vidrio o placas de policarbonato (Brock y Budde 1994). Éstos son inertes, su superficie es fácil de determinar, y son simples de manipular y almacenar (Robinson 1983). Los sustratos se disponen en dispositivos *ad hoc* y se colocan a pocos centímetros por debajo de la superficie del agua. Luego, estos sustratos van siendo colonizados por el perifiton, permitiendo obtener muestras relativamente rápido (Lowe y Pan 1996).

La composición y diversidad de las comunidades perifíticas pueden variar significativamente según el hábitat en el que se encuentren y los factores ambientales a los que se enfrenten (Besemer 2016). Esto determina, en consecuencia, su metabolismo y función dentro del ecosistema (Roos 1983, Mora-Gómez et al. 2016). Cambios ambientales, como la exposición a metales o herbicidas, pueden modificar su estructura y función (Prosser et al. 2015), generando respuestas al estrés tales como el aumento de la producción y secreción de SPE para mayor protección (Klátyik et al. 2017).

Por su sensibilidad a agentes contaminantes y a los cambios en su concentración, se suele utilizar perifiton como bioindicador en el análisis de procesos contaminantes (Dorigo et al. 2010, Iummatto et al. 2019).

### 1.5. Perifiton: estudios ecotoxicológicos

La ecotoxicología ayuda a entender cómo los contaminantes afectan al ambiente (Bundschuh et al. 2017). Los estudios en microcosmos y mesocosmos son muy útiles para evaluar la respuesta de las comunidades acuáticas frente a uno o más contaminantes, ya que, mediante la identificación de los parámetros críticos de las mismas, permiten generar información ecológicamente relevante sobre su estructura y función (La Point 1994, Knauer y Hommen 2012). Estos ecosistemas artificiales experimentales pueden construirse en interiores o exteriores, tanto para evaluar sistemas lóticos como lénticos (Schäfer et al. 2011), y difieren entre sí en cuanto a su volumen, composición de especies, composición química y exposición a condiciones ambientales (Heimbach 1994).

Las algas (principalmente diatomeas y clorofitas) y cianobacterias son los organismos más

estudiados en ecotoxicología acuática (Pesce et al. 2017). Sus respuestas más frecuentes tras la exposición a herbicidas son la disminución de la concentración de oxígeno en el agua, reducción del pH y liberación de nutrientes (Kersting 1994). La toxicidad de estos compuestos puede desencadenar respuestas bioquímicas en los organismos como mecanismos de detoxificación, disminución de la actividad fotosintética y respiratoria, inhibición del crecimiento en especies sensibles y selección de especies más tolerantes, produciendo cambios en la estructura de la comunidad (Guasch et al. 2016). En algunos casos, también se ha observado hormesis, donde la exposición a bajas concentraciones de herbicidas aumenta la síntesis de pigmentos fotosintéticos, metabolitos y proteínas para compensar la inhibición de la fotosíntesis y del crecimiento (Klátyik et al. 2017, Wood et al. 2017).

Los estudios bajo condiciones controladas de laboratorio permiten identificar los impactos directos de los herbicidas sobre los organismos de forma rápida, pero podrían no ser representativos de lo que ocurre con las poblaciones presentes en ambientes naturales. Los estudios de ecotoxicidad a nivel de comunidades microbianas son más adecuados que los estudios a nivel de especies individuales para evaluar los efectos de los contaminantes sobre los microorganismos (Pesce et al. 2009), con una mayor validez de extrapolación. Cada vez son más los estudios sobre los efectos del glifosato sobre comunidades de fitoplancton y perifiton de agua dulce (Vera et al. 2012, 2014, Pizarro et al. 2015, Klátyik et al. 2017, Lozano et al. 2018, Sabio y Garcia et al. 2020, Beecraft y Rooney 2021), tanto en mesocosmos (Pérez et al. 2007, Vera et al. 2010) como en microcosmos (Pesce et al. 2009, Gonzalez et al. 2019, Vera y Trinelli 2021). En la mayoría de estos experimentos, los formulados comerciales de glifosato resultaron más tóxicos que el ingrediente activo para las comunidades, lo cual se atribuyó a los aditivos que acompañan al herbicida (Sáenz et al. 1997, Lipok et al. 2010, Annett et al. 2014, Villamar-Ayala et al. 2019).

Pérez et al. (2007) observaron que el Roundup® en concentraciones de 6 y 12 mg/L causó un aumento de cianobacterias y muerte de organismos en comunidades perifíticas de mesocosmos al aire libre, atribuyendo los cambios en la estructura de las comunidades a efectos toxicológicos directos del glifosato. También se encontró que 10 µg/L de glifosato durante 14 días no afectó la biomasa algal o la diversidad bacteriana, pero sí cambió la composición algal y la diversidad de eucariotas según la estación del año (Pesce et al. 2009). Se reportó que 8 mg/L de Roundup® en la colonización del perifiton en mesocosmos al aire libre retrasó la colonización y aumentó la abundancia de cianobacterias (Vera et al. 2010). En otro estudio, 3,5 mg/L de Glifosato Atanor® favoreció el desarrollo de algas filamentosas (Vera et al. 2012). En condiciones de laboratorio, 3 mg/L de glifosato aumentó

significativamente el contenido de pigmentos de la fracción autótrofa pero sin un efecto diferencial entre el formulado y el ingrediente activo (Vera et al. 2014).

De Stefano et al. (2018) estudiaron los efectos combinados del glifosato grado técnico y los formulados Roundup Max® y Glifosato Atanor® con el mejillón *Limnoperna fortunei* sobre comunidades perifíticas en microcosmos. Observaron que la interacción entre ambos factores (glifosato + mejillón) generó un aumento sinérgico en el desarrollo de la comunidad, adjudicando un mayor efecto a la presencia del mejillón en el sistema. Por otro lado, Lozano et al. (2018) investigaron los efectos sobre la fracción autótrofa del perifiton luego de la exposición, durante 7 días, al glifosato grado técnico, el formulado Glifosato Atanor® y a la mezcla del glifosato con otro herbicida (2,4-D), utilizando mesocosmos al aire libre y concentraciones de 3 mg/L del ingrediente activo en el caso del glifosato grado técnico y su formulado comercial. No fueron detectados cambios significativos en la masa perifítica al aplicar el ingrediente activo o el formulado de cualquiera de los herbicidas, pero sí a nivel especie al mezclar herbicidas diferentes. Al estudiarse los efectos de la exposición de perifiton de agua dulce a 3 mg/L de glifosato grado técnico y a dos formulados comerciales, se observó un incremento de cianobacterias y una disminución de clorofitas y diatomeas, aún mayor con formulados que con glifosato puro (Gonzalez et al. 2019).

Las comunidades perifíticas absorben contaminantes pasiva y activamente, asimilando y transformando materiales disueltos y particulados (Arini et al. 2012). Interactúan con ellos mediante acumulación, secuestro de metales, y transformación de sustancias orgánicas, tanto en el interior de las células como en la matriz (Bonnineau et al. 2020). Pueden acumular herbicidas, insecticidas, fungicidas y metales como Al, Fe y Zn, entre otros (Bonnineau et al. 2020, Rooney et al. 2020). La bioacumulación depende de la naturaleza del contaminante, su concentración, duración de la exposición (Dorigo et al. 2010), parámetros físicos y químicos del ambiente, y también de las características del perifiton (su edad, espesor o composición de sus SPE) (Guasch et al. 2016). El tipo de sustrato donde se desarrolla la comunidad también influye en la exposición a contaminantes y su transferencia a través de la red trófica al ser consumida por sus depredadores (Bonnineau et al. 2020). La bioacumulación de contaminantes podría promover la exposición de los microorganismos que habitan la matriz de la comunidad y, eventualmente, de organismos de niveles tróficos superiores (Beecraft y Rooney 2021), dependiendo de la especie, su desarrollo y fisiología (Bonnineau et al. 2020).

Se observó bioacumulación de glifosato y de su metabolito AMPA en comunidades perifíticas, y también la generación de AMPA dentro de la comunidad debido a la degradación microbiana (Beecraft y Rooney 2021); este proceso podría explicar la rápida



disipación del glifosato en el agua. Además, el perifiton podría actuar como fuente y sumidero de contaminantes en los ecosistemas acuáticos (Bonnineau et al. 2020).

La bioacumulación de herbicidas puede afectar tanto a la fracción autótrofa de la comunidad perifítica (Vera et al. 2014, Feckler et al 2018, Iummato et al. 2019) como a la heterótrofa (Guasch et al. 2016); inhibiendo su crecimiento y alterando su estructura, lo que podría afectar la producción primaria y la actividad fotosintética. Por otro lado, algunas especies de cianobacterias podrían verse estimuladas por el herbicida debido a su capacidad para metabolizar y degradar glifosato, pudiendo utilizarlo como fuente de fósforo para prosperar en ambientes contaminados y formar floraciones (Castro Berman et al. 2020).

#### 1.6. Perifiton: evaluación de la resistencia y recuperación

El ingreso de herbicidas al medio acuático representa un disturbio que puede alterar la estructura y función de las comunidades, reduciendo la diversidad de especies y la provisión de servicios ecosistémicos, llevando al ecosistema a un nuevo estado de equilibrio (Lowe y Pan 1996, Pérez et al. 2011). Los ecosistemas pueden operar en múltiples estados de equilibrio estables. En los lagos poco profundos, por ejemplo, las prácticas agrícolas pueden cambiar el ecosistema de un estado de aguas claras dominado por macrófitas sumergidas (estado pre-disturbio), a un estado de aguas turbias con floraciones algales tóxicas y servicios ecosistémicos reducidos (estado post-disturbio), ambos en equilibrio estable. La restauración del ecosistema a su estado pre-disturbio es difícil, aún con intervención humana intensiva (Bundschuh et al. 2017).

Una comunidad puede enfrentar perturbaciones mediante el aumento de la resistencia o la aceleración del proceso de recuperación. La capacidad de las comunidades para utilizar una o ambas estrategias se conoce como resiliencia (Oliver et al. 2015). La resiliencia de las comunidades se basa en su capacidad para resistir y/o recuperarse rápidamente de los cambios ambientales, manteniendo su estructura estable en el tiempo y conservando sus servicios ecosistémicos (Bundschuh et al. 2017). La biodiversidad es crucial para la resiliencia de las funciones ecosistémicas a largo plazo y luego de múltiples perturbaciones (Oliver et al. 2015). Una alta diversidad funcional y redundancia de especies dentro de la comunidad también son relevantes, ya que sugieren una mayor resiliencia, por lo que la pérdida de una especie puede ser compensada por otras con funciones similares (Bundschuh et al. 2017). Los impactos de los disturbios ambientales dependen de múltiples mecanismos que confieren resiliencia, y que operan a distintos niveles de organización

biológica: a nivel de especie (rasgos de respuesta, tasa intrínseca de crecimiento, plasticidad fenotípica, variabilidad genética), a nivel de comunidad (estructura y composición, redundancia funcional, interacciones de la red) y a nivel de paisaje (heterogeneidad ambiental, conectividad funcional, área cubierta por hábitat natural, potencial de presentar estados alternativos estables) (Oliver et al. 2015).

La recuperación ecosistémica ocurre cuando un ecosistema expuesto a un disturbio evoluciona hacia condiciones pre-disturbio, recuperando su estado “saludable” (Pesce et al. 2017). Esto puede darse por mecanismos internos (por ejemplo, mediante la reproducción de individuos dentro de la zona afectada) o externos (por ejemplo, mediante la migración de individuos de otras regiones hacia la zona afectada) (Kattwinkel et al. 2015). El tiempo de recuperación dependerá de los factores ecológicos, fisicoquímicos, geográficos y temporales del sistema (Schäfer et al. 2011). La utilización de mesocosmos y microcosmos en los estudios de recuperación permiten controlar y estandarizar condiciones de exposición a herbicidas, además permiten la replicabilidad y evaluar las respuestas biológicas a nivel comunidad considerando las posibles interacciones con otros organismos (Pesce et al. 2017).

Las comunidades microbianas son importantes como indicadores de recuperación por su ubicuidad, rápida respuesta a cambios ambientales y diversidad estructural y funcional (Pesce et al. 2017). Dado que el perifiton conforma una interfaz entre la columna de agua y el sustrato, es una de las primeras comunidades en responder a disturbios ambientales provocados por el ingreso de contaminantes, haciendo crucial estudiar su resiliencia frente a estas sustancias para evaluar los riesgos ecológicos asociados a la contaminación (Proia et al. 2011). A su vez, por tener ciclos de vida cortos, puede recuperarse rápidamente tras la exposición a contaminantes (Gustavson et al. 2003), aunque la bioconcentración de estas sustancias en su matriz puede prolongar la duración de la exposición (Pesce et al. 2017, Vera y Trinelli 2021).

La resistencia en comunidades perifíticas puede ser evaluada mediante la observación de cambios en la estructura y en la actividad funcional de la comunidad antes, durante y después de la exposición al contaminante. Por ejemplo, un cambio significativo en la composición de especies puede indicar baja resistencia (Morin et al. 2012), o las actividades enzimáticas, como la de la fosfatasa alcalina, también pueden ser indicadoras de la capacidad funcional del perifiton bajo estrés (Pesce et al. 2017). Una forma común de evaluar la recuperación es mediante translocaciones, trasladando la comunidad microbiana desde un medio expuesto a uno libre de herbicidas, y estudiando los cambios que se producen antes y después de la exposición en sus parámetros críticos estructurales y

funcionales (tasas de crecimiento y reproducción, producción primaria, descomposición) (Pesce et al. 2017). Un retorno a las tasas pre-exposición o los valores de un control, son buenos indicadores de la recuperación de la comunidad (Kattwinkel et al. 2015). En estudios *in situ* (realizados en ríos o arroyos), se transloca perifiton de sitios contaminados a no contaminados aguas arriba del punto de contaminación, evaluando los efectos de la inmigración sobre la recuperación de las comunidades translocadas (Morin et al. 2012). En una revisión de estudios sobre recuperación de comunidades acuáticas y terrestres luego de la aplicación de pesticidas, se concluyó que la composición de las comunidades rara vez se recupera completamente durante los periodos experimentales (Kattwinkel et al. 2015).

Las respuestas toxicológicas a los herbicidas y el potencial de recuperación de la comunidad dependen de la concentración, duración y momento de la exposición, así como de las características de historia de vida de las especies que la conforman (estadío de vida, tamaño y tiempo generacional), la capacidad de dispersión, la abundancia, la fecundidad y el comportamiento (La Point 1994, Kattwinkel et al. 2015). El historial de disturbios de la comunidad también influye sobre el potencial de recuperación de la misma (Wood et al. 2017), ya que la exposición previa a contaminantes puede ejercer una presión selectiva que favorece la dominancia de las especies tolerantes por sobre las sensibles, generando tolerancia frente a exposiciones posteriores (Prosser et al. 2013). Este fenómeno se conoce como “tolerancia comunitaria inducida por contaminantes” (Blanck 2002).

Sorprendentemente, a pesar de ser el glifosato el herbicida más utilizado en el mundo, sólo existe un estudio sobre la recuperación de especies algales ante este herbicida (Sáenz y Di Marzio 2009) y dos experimentos de recuperación en laboratorio con comunidades perifíticas (Vera y Trinelli 2021, Bernini 2022). Estos dos últimos estudios de recuperación fueron llevados a cabo en laboratorio con comunidades perifíticas desarrolladas sobre sustratos artificiales y, luego de la exposición al glifosato, fue estudiada su recuperación por transferencia a un medio libre de herbicida. En el experimento de Vera y Trinelli (2021) se trabajó con perifiton expuesto durante 7 días a dos concentraciones de sal mono isopropilamina de glifosato (0,4 y 4 mg/L). Los resultados mostraron que el perifiton expuesto a la concentración más baja de herbicida recuperaba la mayoría de los parámetros estructurales estudiados a los 7 días; sin embargo, la estructura taxonómica no se logró recuperar hacia la del tratamiento control a lo largo del estudio. El perifiton se vio fuertemente afectado cuando estuvo expuesto al herbicida a altas concentraciones y no pudo recuperar ninguno de sus parámetros estructurales durante 3 semanas en agua libre de glifosato. Estos resultados sugieren un efecto duradero del herbicida debido a su persistencia dentro de la matriz del biofilm, incluso después de la translocación del perifiton

a agua libre de herbicida. También confirman que la concentración de exposición modula el potencial de recuperación del perifiton afectado. Este estudio fue el primero en analizar la recuperación del perifiton (o cualquier otra comunidad microbiana de agua dulce) expuesto al herbicida más utilizado en el mundo (Vera y Trinelli 2021). En el estudio de Bernini (2022), el perifiton fue expuesto por 1 semana a distintos formulados comerciales de glifosato. Luego de la exposición, se evaluó la recuperación de algunos parámetros estructurales de la comunidad, y se observó que el perifiton lograba recuperar la mayoría de sus parámetros pasados 10 días de haber translocado los sustratos a agua libre de herbicida. A partir de estos ensayos de laboratorio quedan aún varios interrogantes, algunos de los cuales buscamos abordar en esta tesis.

Consideramos que la evaluación de los efectos de los contaminantes sobre las comunidades microbianas, incluida su recuperación, es fundamental para la protección de la biodiversidad y los ecosistemas. Actualmente, se sabe bastante sobre los impactos del glifosato en el perifiton; sin embargo, considerando las grandes cantidades de glifosato que se utilizan en el mundo, es llamativo que existan pocos trabajos que comparen la tolerancia o resistencia al glifosato en comunidades perifíticas y que estudien su potencial de recuperación luego de la exposición al herbicida.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

El objetivo general de esta tesis es evaluar la resistencia de comunidades perifíticas (con distintos tiempos de colonización sobre sustratos artificiales) expuestas al herbicida glifosato y su potencial de recuperación, luego de ser translocadas a un medio libre de herbicida.

A continuación, presentamos los objetivos específicos (OE) y las hipótesis de trabajo (HT).

- **OE 1.** Estudiar los efectos de la exposición al glifosato, como sal monoisopropilamina, en perifiton de agua dulce con distinto tiempo de colonización sobre sustratos artificiales, en microcosmos de laboratorio, analizando peso seco, cenizas, peso seco libre de cenizas, concentración de clorofila *a* y el índice autotrófico.

Dado que una comunidad con una matriz más madura y gruesa puede limitar aún más el contacto y reducir la exposición de los organismos a los contaminantes externos (Lozano et al. 2018), esperamos que:

**HT 1.1.** la comunidad con mayor tiempo de desarrollo sea más resistente. Por lo tanto, esperamos que la magnitud de efecto del glifosato sobre sus variables sea menor en comparación con la comunidad con un período de colonización más corto.

- **OE 2.** Evaluar el potencial de recuperación de las variables perifíticas a valores control en comunidades con distinto tiempo de colonización sobre sustratos artificiales tras ser expuestas al glifosato y luego translocadas a un medio libre de herbicida.

Debido a las altas tasas de crecimiento, los cortos tiempos generacionales y buena capacidad de dispersión del perifiton (Steinman y McIntire 1990), esperamos que:

**HT 2.1.** luego de translocar los sustratos a un medio libre de herbicida, las comunidades perifíticas recuperen sus características hasta niveles control durante el período de recuperación.

Dada una mayor acumulación y persistencia de contaminantes dentro de una matriz de biofilm más gruesa (Lawrence et al. 2001), planteamos que:

**HT 2.2.** la comunidad perifítica desarrollada durante un período de tiempo más prolongado tardará más en recuperar sus características en comparación con la comunidad con menor tiempo de colonización, luego de la translocación de los sustratos a un medio libre de herbicida.

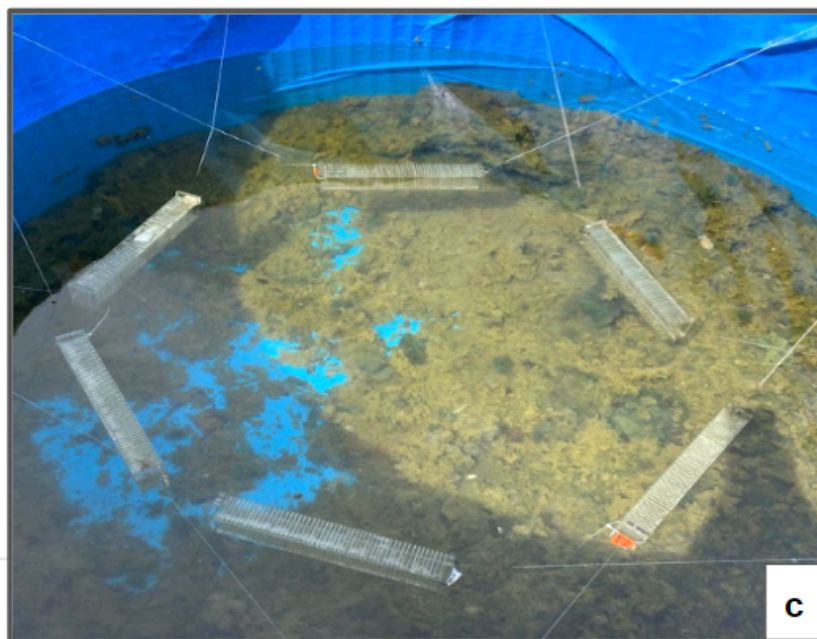
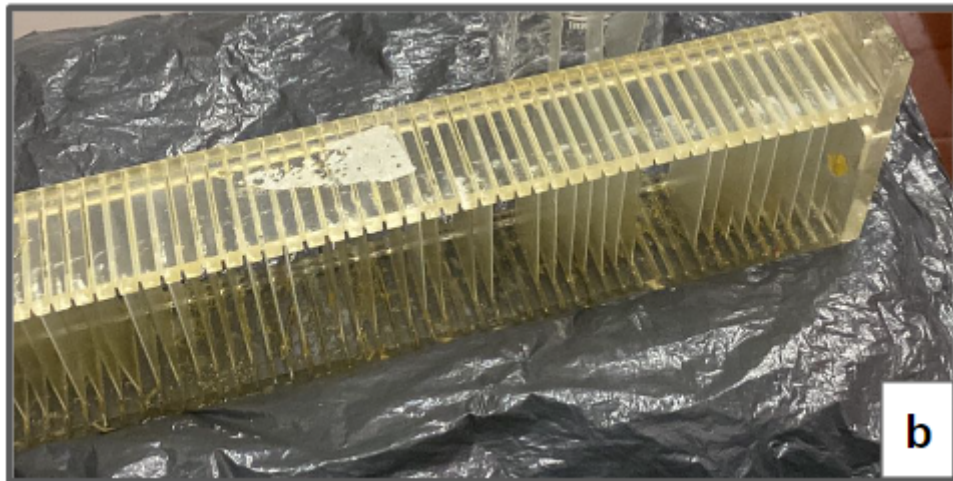
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Realizamos un experimento de laboratorio en el cual utilizamos perifiton desarrollado sobre sustratos artificiales en un cuerpo de agua sin historia previa de exposición al glifosato. En particular, estudiamos dos comunidades perifíticas con distintos tiempos de colonización, y por lo tanto, diferente grado de madurez y espesor, expuestas en el laboratorio a una concentración conocida de glifosato (0,4 mg/L) durante 8 días. Luego de la exposición, trasvasamos los sustratos con perifiton a un medio acuoso libre de herbicida para estudiar el potencial y la trayectoria de recuperación de las comunidades durante 21 días.

#### 3.1. Colonización perifítica al aire libre

Previo al inicio del experimento, colocamos en un tanque al aire libre de 3000 litros (que ya contaba con una comunidad microbiana consolidada sin previa exposición a contaminantes), ubicado en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (*Figura 3.1a*), dispositivos *ad hoc* (perifitómetros) para sostener los sustratos artificiales (acetato de alto impacto) durante la colonización del perifiton (*Figura 3.1b*). Dos meses antes de comenzar la experiencia, dispusimos sub-superficialmente (*Figura 3.1c*) perifitómetros para obtener la comunidad *Perifiton 2* (P2) y un mes después, dispusimos nuevos perifitómetros para obtener *Perifiton 1* (P1). Por lo tanto, al momento de comenzar la experiencia de laboratorio, contábamos con dos comunidades perifíticas con distinto tiempo de colonización (1 mes -P1- y 2 meses -P2-).





**Figura 3.1.** *(a) Campo experimental con tanques experimentales al aire libre. (b) Perifitómetro con sustratos artificiales. (c) Perifitómetros dispuestos sub-superficialmente en el tanque.*

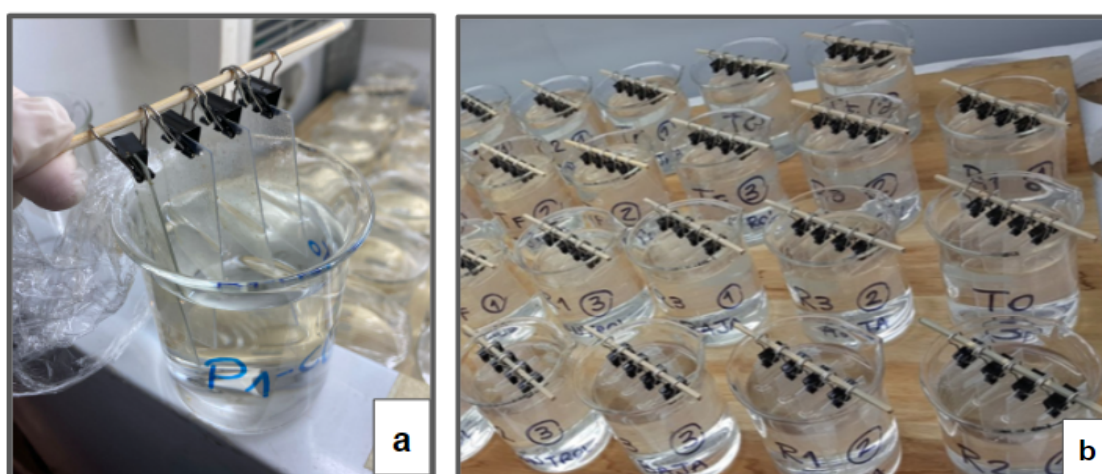
Durante el periodo de colonización perifítica, entre septiembre y noviembre del año 2022 (primavera en Buenos Aires), realizamos monitoreos periódicos del agua del tanque. Medimos *in situ* el oxígeno disuelto, la temperatura, el pH y la conductividad, y también tomamos muestras para medir la turbidez, fósforo total y concentración de clorofila *a* fitoplanctónica en el agua.



### 3.2. Microcosmos en laboratorio

Luego de la colonización, retiramos los perifitómetros con los sustratos colonizados del tanque y los trasladamos desde el Campo Experimental hasta el laboratorio en condiciones de oscuridad y frío.

En el laboratorio, dispusimos al azar 72 unidades experimentales (u.e.), en una cámara de cultivo con condiciones controladas de luz ( $1500 \pm 0,1$  lux), temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y fotoperíodo (12/12 hs luz/oscuridad), y las dejamos aclimatar a las condiciones de laboratorio por 48 horas. Cada u.e. (microcosmos, *Figura 3.2*) consistió en un vaso de precipitados autoclavado con 250 ml de agua del tanque, filtrada por una red de  $18 \mu\text{m}$  y autoclavada, y 4 sustratos colonizados inmersos verticalmente mediante dispositivos *ad hoc* (36 u.e. con perifiton P1 y 36 u.e. con P2). En las mismas condiciones que las u.e. descritas, colocamos 36 vasos con agua del tanque, filtrada y autoclavada, que serían utilizados posteriormente para el periodo de recuperación del experimento con agua libre de herbicida.



**Figura 3.2. (a)** Unidad experimental (microcosmos) con agua del tanque, filtrada y autoclavada, y cuatro sustratos colonizados dispuestos verticalmente. **(b)** Cámara de cultivo con las unidades experimentales.

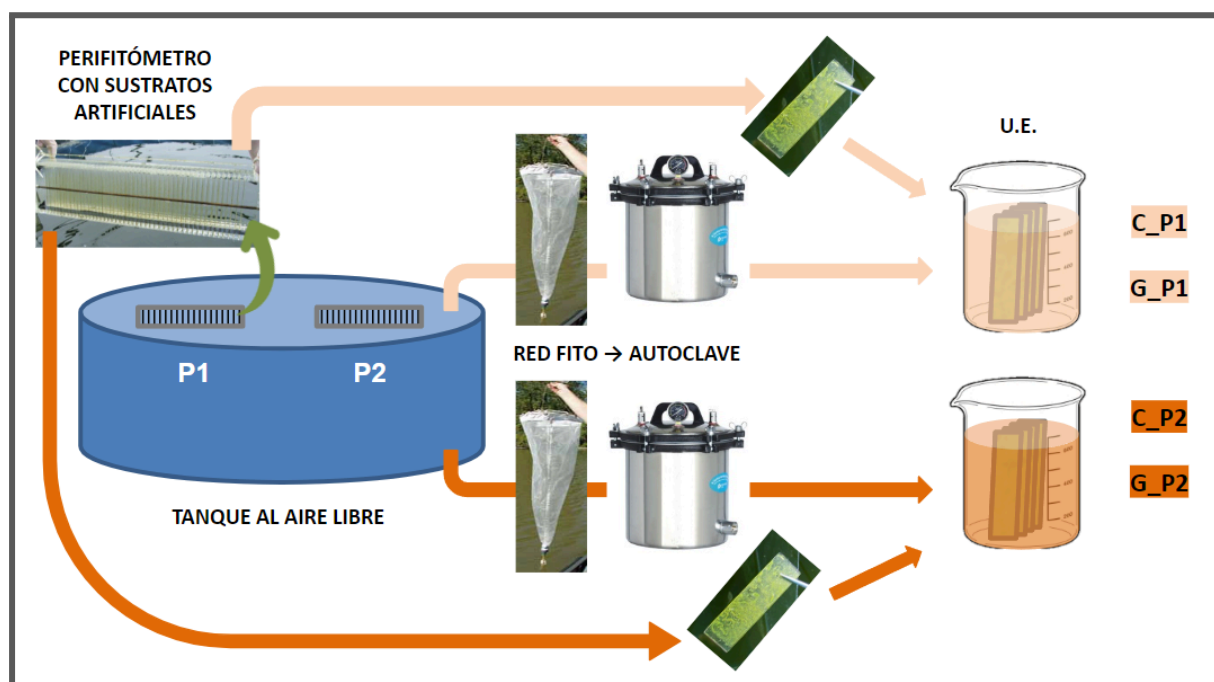
### 3.3. Tratamientos y períodos: exposición y recuperación

El primer día de la experiencia, asignamos el herbicida al azar a las unidades experimentales. Agregamos una solución de sal monoisopropilamina de glifosato (G; 40 % p/v, CAS: 38641-94-0, SIGMA Aldrich) a la mitad de las u.e. con P1 y a la mitad con P2,



para obtener una concentración final de 0,4 mg/L de glifosato en cada vaso. El resto de las u.e. fueron controles (C) sin agregado de herbicida. Quedaron establecidos 4 tratamientos (*Figura 3.3*): (i) control con *Perifiton 1* (C\_P1); (ii) glifosato con *Perifiton 1* (G\_P1); (iii) control con *Perifiton 2* (C\_P2); y (iv) glifosato con *Perifiton 2* (G\_P2). Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Utilizamos esta concentración de glifosato con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en esta experiencia con los reportados previamente por Vera y Trinelli (2021) y Bernini (2022), quienes emplearon una concentración similar. Además, decidimos estudiar los efectos de la sal monoisopropilamina de glifosato, en lugar de formulados basados en glifosato, debido a que estos últimos contienen mezclas de aditivos que pueden alterar la toxicidad del compuesto (Vera et al. 2014). Dado que son las primeras investigaciones sobre recuperación, consideramos fundamental analizar inicialmente los efectos del principio activo solo, para posteriormente incorporar a nuestros estudios los efectos de las formulaciones comerciales.



**Figura 3.3.** Esquema del diseño experimental.

Durante el experimento fueron considerados dos períodos: el período de exposición y el período de recuperación. Durante el *período de exposición*, tomamos muestras el día que

comenzó la experiencia (T0) y 8 días después (T8) del agregado de glifosato. Al día 8, las u.e. fueron translocadas a vasos de precipitados conteniendo agua libre de herbicida (filtrada y autoclavada). Luego, durante el *período de recuperación* tomamos muestras a los 5, 10, 15 y 21 días (R5, R10, R15 y R21, respectivamente) para evaluar la recuperación de las comunidades.

En cada tiempo de muestreo, retiramos de la cámara de cultivo 3 u.e. por tratamiento para determinar distintas variables del perifiton y las concentraciones de glifosato, nutrientes y clorofila *a* fitoplanctónica en el agua. También medimos la concentración de oxígeno disuelto, turbidez nefelométrica, pH, conductividad y temperatura en cada microcosmos en cada tiempo. Para determinar las condiciones iniciales del medio para el periodo de recuperación (R0), medimos las mismas variables en el agua de los vasos sin sustratos.

#### 3.4. Determinaciones cuantitativas

La concentración de oxígeno disuelto fue medida con un oxímetro YSI® ProODO y la temperatura, pH y conductividad con un sensor portátil multiparamétrico LUTRON®. La turbidez fue determinada con un turbidímetro portátil HACH® 2100P.

La concentración de fósforo total (PT) en las muestras de agua fueron determinadas utilizando un espectrofotómetro Hach® DR/2010 y su correspondiente kit de reactivos. El PT se determinó a partir de muestras de agua sin filtrar luego de la digestión ácida con persulfato de potasio.

Para determinar la concentración de clorofila *a* fitoplanctónica, filtramos las muestras de agua a través de filtros de fibra de vidrio Sartorius GF/F. Estos filtros fueron inmediatamente envueltos en papel de aluminio y conservados a -20°C hasta su procesamiento. Realizamos la extracción de los pigmentos con acetona y dejamos reposar en heladera a 4°C durante 24 horas. Luego, centrifugamos la muestra a 3000 rpm durante 10 minutos, separamos el sobrenadante y medimos su absorbancia a 665 y 750 nm utilizando un espectrofotómetro HACH® DR/2010, antes y después de la acidificación con HCl 1N (para realizar la deducción por el aporte de feopigmentos) (Marker et al. 1980). Calculamos la concentración de clorofila *a* (en µg/L) según las fórmulas ya propuestas por Lorenzen (1967):

$$[\text{Clorofila } a \text{ sin feopigmentos}] = F * [(Abs\ 665 - Abs\ 750) - (Absa\ 665 - Absa\ 750)] * k * v$$

Donde:

*Abs* = absorbancia antes de acidificar

*Absa* = absorbancia después de acidificar

*F* = factor de corrección (2,43 para acetona)

*k* = coeficiente de absorción específica (10,48 para acetona)

*v* = volumen del extracto en mL / (volumen de muestra en L \* espesor de la cubeta en cm)

El perifiton desarrollado en los sustratos fue removido raspando cuidadosamente la superficie de los mismos y se calculó el área raspada (*Figura 3.4*). El material raspado fue llevado a un volumen conocido con agua destilada, para posteriormente dividirlo en alícuotas de volumen conocido para los diferentes análisis (clorofila *a* perifítica, peso seco, cenizas y peso seco libre de cenizas de cada comunidad). Todas las variables perifíticas fueron expresadas por unidad de área (APHA 2005).



***Figura 3.4. Medición de sustratos ya raspados.***

Para determinar las distintas fracciones de masa del perifiton (peso seco: PS, cenizas: C y peso seco libre de cenizas: PSLC), se calcinaron previamente en mufla (440°C) filtros Sartorius GF/C durante 2 horas y se pesaron (peso del filtro). Se filtraron las muestras a través de estos filtros calcinados, que posteriormente fueron secados en estufa (60-70°C) y pesados. Por diferencia entre este peso y el peso del filtro se obtuvo el peso seco. Estos filtros secos con material 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 peso seco libre de cenizas se obtuvo a partir de la diferencia entre el peso seco y las cenizas (APHA 2005).

Para los análisis de clorofila *a* perifítica (Chl *a*, expresada en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), las muestras se filtraron a través de filtros Sartorius GF/F, que fueron envueltos en papel aluminio y conservados a  $-20^\circ\text{C}$ . La concentración de Chl *a* se estimó según lo explicado anteriormente para determinar la clorofila *a* fitoplanctónica.

Se estimó el índice autotrófico como la relación entre el PSLC y la concentración de Chl *a* perifítica (APHA 2005). Este índice permite estimar la auto/heterotrofia de la comunidad y puede alcanzar valores de varios órdenes de magnitud. Se considera que un valor mayor a 200 indica una alta proporción de organismos heterótrofos, individuos sin clorofila y/o una alta presencia de detritos orgánicos (Lowe y Pan 1996).

### 3.5. Análisis estadístico

Para evaluar las respuestas del perifiton durante los períodos de exposición y recuperación, las distintas variables fueron modeladas usando un modelo lineal general (MLG) con los tratamientos (2 niveles: C y G) y los tiempos de muestreo (6 niveles: T0, T8, R5, R10, R15 y R21) como factores fijos. Ambas comunidades (P1 y P2) fueron analizadas por separado. Se estableció que una variable se recupera cuando no son detectadas diferencias significativas entre el control y el tratamiento con herbicida en un determinado tiempo de muestreo (Kattwinkel et al. 2015).

Para evaluar los efectos sobre las variables del agua de los microcosmos, cada periodo (exposición y recuperación) y las comunidades (P1 y P2) fueron analizados por separado. Estas variables también fueron modeladas utilizando un modelo lineal general con los tratamientos (2 niveles: C y G) y los tiempos de muestreo (2 niveles para el periodo de exposición: T0 y T8, y 5 niveles para el periodo de recuperación: R0, R5, R10, R15 y R21) como factores de efectos fijos.

Se analizaron la normalidad y la homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Cuando fue necesario, se modeló la varianza y se eligió el mejor modelo a partir de la comparación de los AIC (Criterio de Información de Akaike). El test de Tukey se utilizó para realizar comparaciones múltiples de medias *a posteriori*.

Se llevaron a cabo tests de *t* para muestras independientes, previa comprobación de la normalidad: (i) para comparar las variables perifíticas de ambas comunidades (P1 vs P2) a

tiempo inicial (T0), y (ii) para comparar las magnitudes de efecto del glifosato, entre ambas comunidades (P1 vs P2), sobre las variables del perifiton a los 8 días de exposición (T8). A T0, según el MLG, no se detectaron diferencias significativas en ninguna de las variables del perifiton entre el herbicida y el control, para P1 ni para P2. Por lo tanto, para llevar a cabo los tests de t a T0 (i) se utilizaron como réplicas los 6 valores de cada variable (3C+3G) para cada comunidad. Para los test de t a T8 (ii), la magnitud de efecto para cada variable se calculó como la diferencia absoluta entre G y C a T8, restando la magnitud de efecto promedio a T0 (para independizarnos de las diferencias iniciales entre P1 y P2 a T0).

En todos los casos, se consideró un  $p\text{-valor} < 0,05$  como estadísticamente significativo. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando R (R Core Team 2024).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Variables del agua del tanque experimental

La media de las medidas *in situ* de concentración de oxígeno disuelto, temperatura, pH y conductividad, y las determinaciones de turbidez y concentración de fósforo total y clorofila *a* fitoplanctónica en el agua durante el período de colonización de los sustratos artificiales en el tanque experimental se presentan en la *Tabla 4.1*.

Variable	n	Media $\pm$ 1 DE
Turbidez (NTU)	6	0,87 $\pm$ 0,31
Temperatura (°C)	6	20,65 $\pm$ 3,39
Oxígeno disuelto (mg/L)	6	11,74 $\pm$ 1,38
pH	6	9,78 $\pm$ 0,18
Conductividad (mS/cm)	6	0,45 $\pm$ 0,05
Fósforo total (mg/L)	6	0,05 $\pm$ 0,01
Clorofila <i>a</i> fitoplanctónica ( $\mu$ g/L)	6	2,53 $\pm$ 0,61

**Tabla 4.1.** Características físicas, químicas y biológicas del agua del tanque durante la colonización del perifiton entre los días 19/09/2022 y 19/11/2022. DE = desvío estándar, n = número de réplicas.

### 4.2. Variables del agua de los microcosmos

La temperatura del agua de los microcosmos en la cámara de cultivo se mantuvo en un rango de 21,7°C a 22,8°C durante el tiempo que duró el experimento.

En la *Tabla 4.2* se muestran la media de la concentración de oxígeno disuelto, el pH, la conductividad, la turbidez nefelométrica, concentración de fósforo total y de clorofila *a* fitoplanctónica en el agua de los microcosmos para cada tratamiento herbicida, comunidad y tiempo de muestreo. Los p-valores de los modelos lineales generales para las variables figuran en el *Anexo 1*.

	PERIFITON	P1		P2	
	HERBICIDA	C	G	C	G
Variable	TIEMPO	C_ P1	G_ P1	C_ P2	G_ P2
Turbidez (NTU)	T0	1,07±0,12	1,00±0,00 *	1,00±0,00 *	1,17±0,15 *
	T8	1,57±0,38	4,00±1,00	4,67±0,58	8,00±1, 00
	-----	-----	-----	-----	-----
	R0	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00
	R5	3,00±1,00	4,00±1,00	3,00±1,00	5,67±2,08
	R10	4,33±1,53	5,67±2,08 *	5,33±1,15	12,00±5,57
	R15	5,67±2,89	13,00±3,61	5,67±1,15	12,33±2,52
	R21	5,00±1,00	13,00±3,46	5,00±1,00	13,67±2,08
Oxígeno disuelto (mg/L)	T0	8,91±0,19 x	8,93±0,16 x	9,03±0,07 x	9,00±0,19 x
	T8	8,20±0,02	8,16±0,04	7,95±0,04	7,88±0,05
	-----	-----	-----	-----	-----
	R0	7,50±0,02 x	7,50±0,02 x	7,50±0,02 *	7,50±0,02 *
	R5	8,31±0,13	8,18±0,12	8,18±0,04	8,21±0,09

	<b>R10</b>	8,28±0,13 x	8,51±0,04 x	8,19±0,09 *	8,13±0,10
	<b>R15</b>	8,03±0,12 x	7,91±0,15 x	7,84±0,14	7,96±0,08
	<b>R21</b>	8,21±0,16	8,13±0,12	<b>8,10±0,18</b>	<b>7,73±0,15</b>
pH	<b>A</b>		<b>B</b>		
	<b>T0</b>	7,99±0,29	7,77±0,02	7,91±0,04	7,91±0,22
	<b>T8</b>	7,98±0,03	7,76±0,07	7,86±0,07	7,76±0,06
	-----	-----	-----	-----	-----
	<b>A</b>		<b>B</b>		
	<b>R0</b>	7,84±0,06	7,84±0,06	7,84±0,06	7,84±0,06
	<b>R5</b>	7,94±0,09	7,89±0,03	7,85±0,10	7,89±0,04
	<b>R10</b>	8,01±0,07	7,89±0,11	7,99±0,03 x	7,96±0,04 x
	<b>R15</b>	8,01±0,08	7,84±0,05	7,89±0,03	7,88±0,03
	<b>R21</b>	8,06±0,04	7,90±0,02	7,97±0,06	7,93±0,08
Conductividad (mS/cm)	<b>A</b>		<b>B</b>		
	<b>T0</b>	0,53±0,01 x	0,42±0,01 x	0,54±0,01 x	0,40±0,01 x
	<b>T8</b>	0,60±0,03	0,64±0,02	0,63±0,02	0,64±0,02
	-----	-----	-----	-----	-----
	<b>R0</b>	0,55±0,00	0,55±0,00	0,55±0,00	0,55±0,00
	<b>R5</b>	0,64±0,01	0,63±0,02	0,62±0,01	0,63±0,01
	<b>R10</b>	0,66±0,03 x	0,73±0,07 x	0,70±0,05 x	0,74±0,03 x
	<b>R15</b>	0,84±0,15	0,86±0,07	0,78±0,06 x	0,77±0,00 x



	<b>R21</b>	0,92±0,09	0,91±0,02	0,90±0,07	1,00±0,11
Clorofila a fitoplanctónica (µg/L)	<b>T0</b>	1,36±0,58	1,35±0,58	0,59±0,59	1,71±0,57
		<b>x x</b>		<b>x x</b>	
	<b>T8</b>	1,99±1,32	4,15±1,72	4,58±1,55	8,29±2,77
	-----	-----	-----	-----	-----
	<b>R0</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
					*
	<b>R5</b>	3,44±0,75	2,77±1,74	2,37±1,21	5,07±2,93
					*
Fósforo total (mg/L)	<b>R10</b>	5,72±0,82	7,45±0,22	5,83±1,45	9,78±0,47
	<b>R15</b>	<b>5,32±3,30</b>	<b>12,90±4,24</b>	<b>4,07±2,04</b>	<b>13,58±1,18</b>
	<b>R21</b>	<b>4,37±2,15</b>	<b>11,54±4,24</b>	<b>5,43±1,18</b>	<b>12,71±1,38</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	
	<b>T0</b>	0,04±0,01	0,42±0,01	0,04±0,01	0,40±0,02
				<b>x x</b>	
	<b>T8</b>	0,05±0,01	0,36±0,20	0,06±0,01	0,45±0,01
	-----	-----	-----	-----	-----
	<b>R0</b>	0,05±0,03	0,05±0,03	0,05±0,03	0,05±0,03
	<b>R5</b>	0,06±0,01	0,07±0,02	0,06±0,01	0,06±0,01
	<b>R10</b>	0,08±0,03	0,08±0,02	0,07±0,01	0,08±0,01
	<b>R15</b>	0,08±0,03	0,09±0,02	0,08±0,01	0,08±0,02
	<b>R21</b>	0,11±0,03	0,11±0,02	0,10±0,02	0,12±0,07

**Tabla 4.2.** Características físicas, químicas y biológicas del agua de los microcosmos para cada tratamiento durante los períodos de exposición (T0-T8) y recuperación (R0-R21). Se presentan los valores medios  $\pm$  1 desvío estándar. Las variables fueron analizadas mediante un modelo lineal general con herbicida y tiempo como efectos fijos, cada periodo (exposición y recuperación) y las comunidades (P1 y P2) fueron analizados por separado.

En los casos donde la *interacción herbicida-tiempo fue significativa*: las diferencias entre tiempos consecutivos para el mismo tratamiento se indican con un asterisco (\*), y las diferencias entre C y G para un mismo tiempo se indican con los valores en negrita. En los casos donde la *interacción no fue significativa pero sí el factor tiempo*: las diferencias entre tiempos consecutivos se indican con doble cruz (xx). En cambio, en los casos donde la *interacción no fue significativa pero sí el factor herbicida*: las diferencias entre C y G se indican con letras mayúsculas distintas en negrita. P1 = *perifiton de un mes de colonización*, P2 = *perifiton de dos meses de colonización*, C = *control*, G = *sal monoisopropilamina de glifosato*. *Tiempos de muestreo: inmediatamente después (T0) y 8 días posteriores (T8) del agregado de glifosato, y a los 0, 5, 10, 15 y 21 días luego de la translocación de los sustratos colonizados a un medio sin herbicida (R0, R5, R10, R15 y R21, respectivamente).*

En el periodo de exposición y en presencia de ambas comunidades, los valores de turbidez resultaron significativos para la interacción de los factores (P1: p-valor=0,0038081 y P2: p-valor=0,0015237). Según las comparaciones de a pares (Tukey), la turbidez mostró un aumento en T8 respecto a T0 en todos los microcosmos, que no resultó significativo únicamente en el control con P1 (*Tabla 4.2*). También resultaron significativas las diferencias entre tratamientos a T8, con mayores valores de turbidez en el medio con glifosato (P1:  $4,00 \pm 1,00$  NTU; P2:  $8,00 \pm 1,00$  NTU) en comparación a los controles. Los valores de turbidez en el periodo de recuperación, con presencia de las comunidades P1 y P2, resultaron nuevamente significativos para la interacción herbicida-tiempo (p-valor=0,0054974 y p-valor=0,02156 con P1 y P2, respectivamente). En este periodo, esta variable no presentó aumentos significativos en los controles hasta el final del experimento, con ambas comunidades presentes. En los vasos con el perifiton que había sido expuesto al glifosato, la turbidez aumentó entre R10 y R15 con P1 y entre R5 y R10 con P2. Esto generó las diferencias significativas observadas con respecto a los controles, a partir de R15 con P1 y a partir de R10 con P2, hasta los 21 días de la recuperación en agua libre de herbicida, tiempo en el que se alcanzaron los máximos valores promedio de turbidez,  $13,00 \pm 3,46$  NTU para P1 y  $13,67 \pm 2,08$  NTU para P2.

La mayor concentración media de oxígeno disuelto de todo el estudio se observó a tiempo inicial, en ambos tratamientos y comunidades (*Tabla 4.2*). En T8 se registró una disminución significativa de oxígeno en el agua en presencia de ambas comunidades (p-valor= $8,675 \times 10^{-6}$  para P1 y p-valor= $8,871 \times 10^{-8}$  para P2). El menor valor de OD durante el periodo de exposición se registró en el tratamiento con glifosato con la comunidad P2 (T8,  $7,88 \pm 0,05$  mg/L). Durante el periodo de recuperación, los microcosmos con la comunidad

P1 mostraron diferencias significativas respecto al tiempo ( $p\text{-valor}=9,919\times 10^{-11}$ ), en cambio, con P2 la interacción entre los factores fue significativa ( $p\text{-valor}=0,00584$ ). La concentración de oxígeno disuelto en el agua aumentó a R5 con respecto a R0, con ambas comunidades y tratamientos. Mientras que disminuyó desde R10 a R15. Al final del experimento, con la comunidad P2 presente, el oxígeno disuelto medio en G fue significativamente menor al del tratamiento control.

El menor valor medio de pH se registró a los 8 días del periodo de exposición en el agua con herbicida, independientemente de la comunidad perifítica presente en los vasos (*Tabla 4.2*). Durante la exposición, el pH fue significativamente menor en presencia de glifosato con la comunidad P1 ( $p\text{-valor}=0,04009$ ). En el periodo de recuperación, con P1, se observaron diferencias significativas tanto en el factor herbicida como en el factor tiempo ( $p\text{-valor}=0,0004166$  y  $p\text{-valor}=0,0251143$ , respectivamente). El pH fue menor en los vasos con la comunidad P1 que había sido expuesta a glifosato previamente. Los valores de pH en R21 fueron máximos (P1:  $8,06\pm 0,04$  en C y  $7,90\pm 0,02$  en G) y significativamente mayores que a R0. Para los microcosmos con la comunidad P2, las diferencias significativas en el pH se encontraron solo en el factor tiempo ( $p\text{-valor}=0,002156$ ), con valores significativamente mayores en R10 con respecto a los valores iniciales del periodo, R0 y R5. Los valores medios máximos con P2 se alcanzaron en R10 para ambos tratamientos ( $7,99\pm 0,03$  en C y  $7,96\pm 0,04$  en G).

La menor conductividad promedio se registró a T0 en los vasos con glifosato (P1:  $0,42\pm 0,01$  mS/cm, P2:  $0,40\pm 0,01$  mS/cm), mientras que los mayores valores fueron a R21 (C\_P1:  $0,92\pm 0,09$  mS/cm, G\_P2:  $1,00\pm 0,11$  mS/cm). En el periodo de exposición, se encontraron diferencias significativas en la conductividad para los factores herbicida y tiempo ( $p\text{-valor}=0,04077$  y  $p\text{-valor}=3,277\times 10^{-5}$ , respectivamente) en los microcosmos con P1. En cambio, con la comunidad P2, las diferencias significativas fueron únicamente para el factor tiempo ( $p\text{-valor}=1,068\times 10^{-6}$ ). La conductividad inicial (T0) fue menor en los vasos inmediatamente después de agregar el glifosato en el agua, comparada con los controles sin herbicida. Luego de 8 días, los valores de conductividad aumentaron en todos los tratamientos con ambas comunidades, alcanzando niveles similares al finalizar el periodo de exposición (*Tabla 4.2*). Durante el periodo de recuperación, se encontraron diferencias significativas en la conductividad únicamente para el factor tiempo con ambas comunidades ( $p\text{-valor}=1,806\times 10^{-8}$  con P1 y  $p\text{-valor}=6,425\times 10^{-11}$  con P2). Hubo un aumento gradual de la conductividad con el tiempo en el agua libre de herbicida, significativa desde R10 con P2 y desde R15 con P1, hasta el final del experimento.

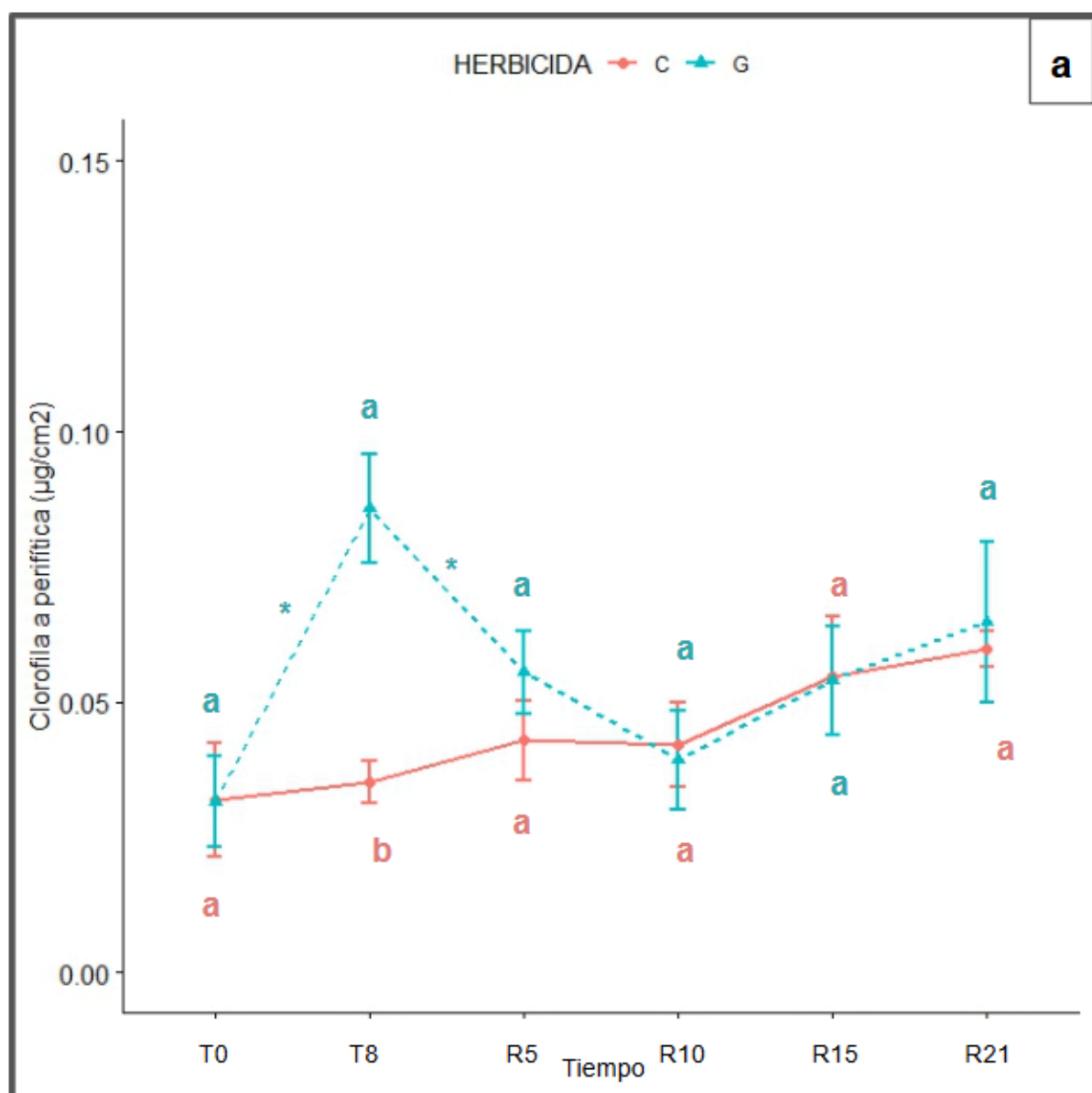
El agua de las unidades experimentales fue inicialmente filtrada y autoclavada, sin embargo se registraron valores de clorofila *a* fitoplanctónica en todos los vasos de precipitados a T0 (*Tabla 4.2*). Con la presencia de ambas comunidades, hubo únicamente diferencias significativas en el factor tiempo (P1, p-valor=0,03449 y P2, p-valor=0,0008459) para el periodo de exposición, con un aumento de la concentración de clorofila *a* fitoplanctónica a T8 con respecto a T0. A los 8 días de iniciado el experimento, el agua de los vasos con el perifiton con 1 y 2 meses de colonización presentó los valores más altos de clorofila *a* planctónica de este periodo, cuando había presencia de herbicida en el medio, con valores medios de  $8,29 \pm 2,77$  µg/L para la comunidad más madura y de  $4,15 \pm 1,72$  µg/L para la más joven. En las u.e. con ambas comunidades, se registraron diferencias significativas en la interacción herbicida-tiempo (p-valor=0,012584 y p-valor=0,0001303 para P1 y P2, respectivamente) en el periodo de recuperación. Al inicio del periodo de recuperación, el agua no presentó valores de clorofila *a* por haberse filtrado y autoclavado. Según comparaciones de a pares, en los microcosmos con la presencia de las dos comunidades, no se obtuvieron diferencias entre tiempos de muestreo consecutivos en los controles. Los valores de clorofila *a* aumentaron significativamente desde R0 hasta R10, con la comunidad P2 expuesta al herbicida. Estos altos valores registrados a R10 se mantuvieron hasta el final del experimento. En R15 y R21, la clorofila *a* fitoplanctónica en el medio con glifosato fue significativamente mayor a los controles, en presencia de P1 y P2.

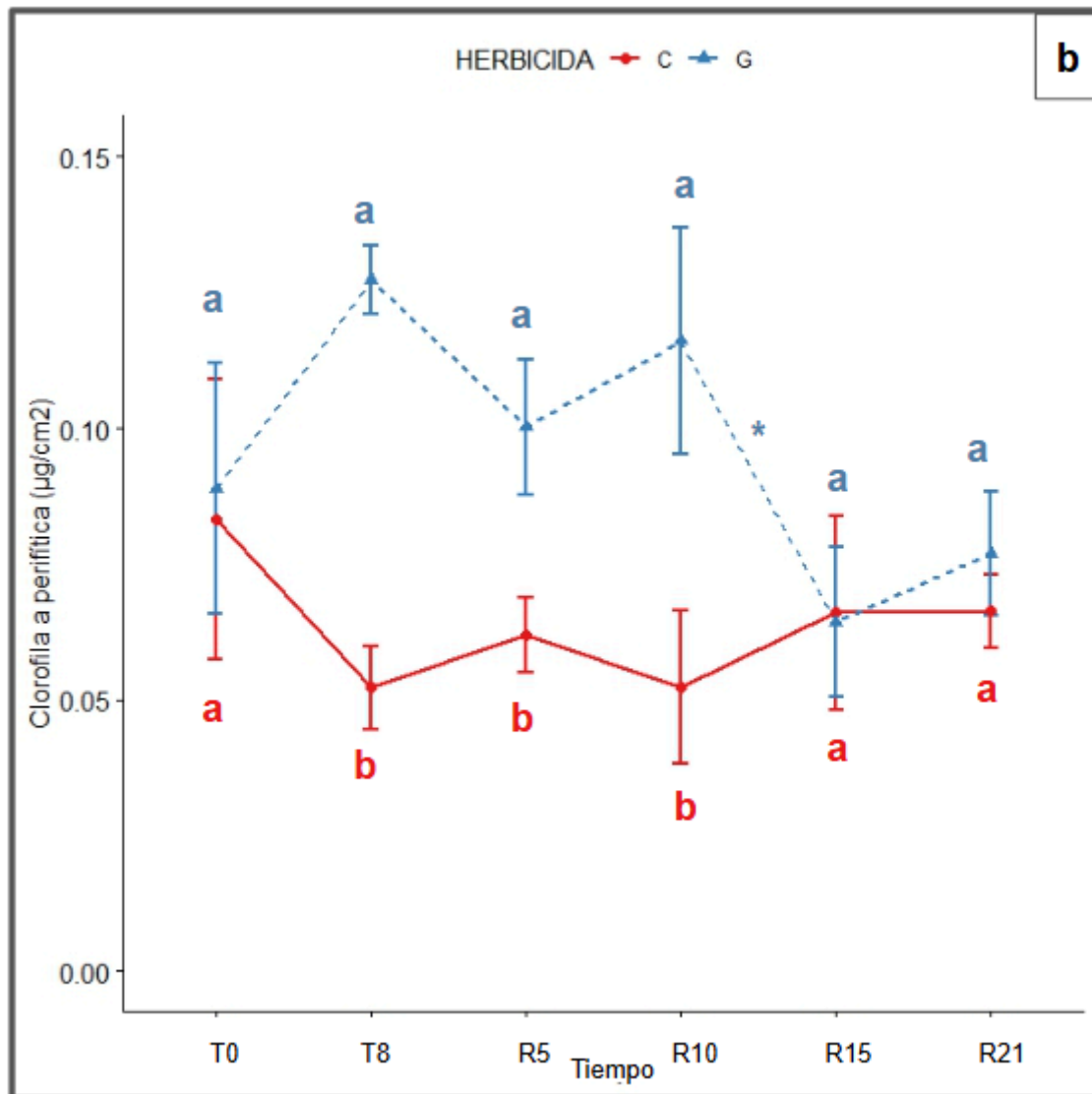
La mayor concentración media de fósforo total (PT) del experimento se registró durante el periodo de exposición en los vasos con glifosato (*Tabla 4.2*). Con la comunidad P1 en el vaso, se detectaron diferencias significativas en el PT únicamente en el factor herbicida (p-valor=0,0003117), con mayores valores en G. Mientras que con la comunidad P2 se encontraron diferencias significativas en el tiempo (p-valor=0,003293) y en el factor herbicida (p-valor= $3,589 \times 10^{-11}$ ), con mayor concentración de PT en presencia de glifosato y a T8. Durante el periodo de recuperación, las diferencias en las concentraciones de fósforo total del agua de los microcosmos fueron significativas solo para el factor tiempo, tanto con P1 (p-valor=0,01229) como con P2 (p-valor=0,02554). En este periodo, se observó un aumento gradual del fósforo total con el tiempo, alcanzando sus máximos en R21 con valores de aproximadamente el doble comparados con R0.

#### 4.3. Variables del perifiton en los microcosmos

A tiempo inicial, el promedio de clorofila *a* para la comunidad P1 fue  $0,032 \pm 0,009$  µg/cm<sup>2</sup> (para ambos tratamientos juntos), mientras que para P2 ( $0,086 \pm 0,022$  µg/cm<sup>2</sup>) el valor fue

significativamente mayor (test-t, p-valor=0,00106). Se detectaron diferencias significativas en la interacción tratamiento-tiempo para esta variable para ambas comunidades (MLG, P1: p-valor=0,0002496; P2: p-valor=0,00051). Para P1 y P2, la concentración de clorofila *a* no reflejó diferencias significativas entre C y G a T0; sin embargo, a T8 la Chl *a* del perifiton sometido a glifosato presentó un aumento, resultando en una concentración mayor que la del control (*Figura 4.1*). La magnitud del efecto del glifosato sobre la concentración de clorofila *a* perifítica de P2 no difirió significativamente de la de P1 a T8 (test-t, p-valor=0,1173). A lo largo de todo el período de estudio, la Chl *a* del perifiton, tanto P1 como P2, en los microcosmos control no presentó diferencias en el tiempo entre muestreos consecutivos. En el período de recuperación, se registró una disminución de la clorofila *a* en los microcosmos con G, alcanzando valores medios de Chl *a* sin diferencias significativas con el T0. Esta disminución resultó significativa a R15 con respecto a R10 para el perifiton con 2 meses de desarrollo sobre los sustratos, pero mucho antes para la comunidad con 1 mes de colonización, que la registró a R5 con respecto a la concentración media a T8. Como resultado de esta disminución en la clorofila *a* de las comunidades durante la recuperación en un medio libre de herbicida, la concentración disminuyó hasta valores control y no se registraron diferencias entre C y G a partir de R5 para P1 y a partir de R15 para P2, hasta el final del experimento.

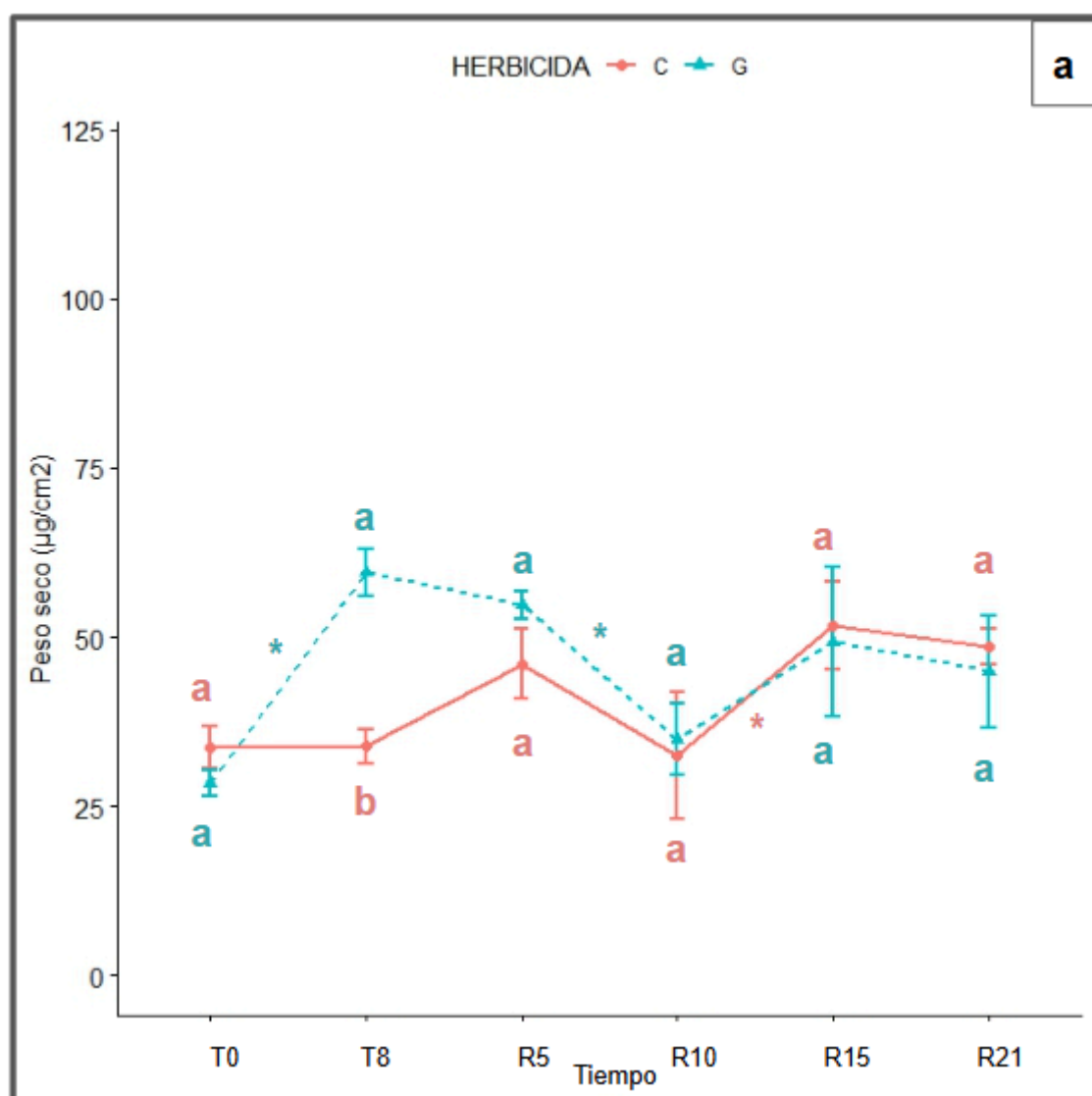


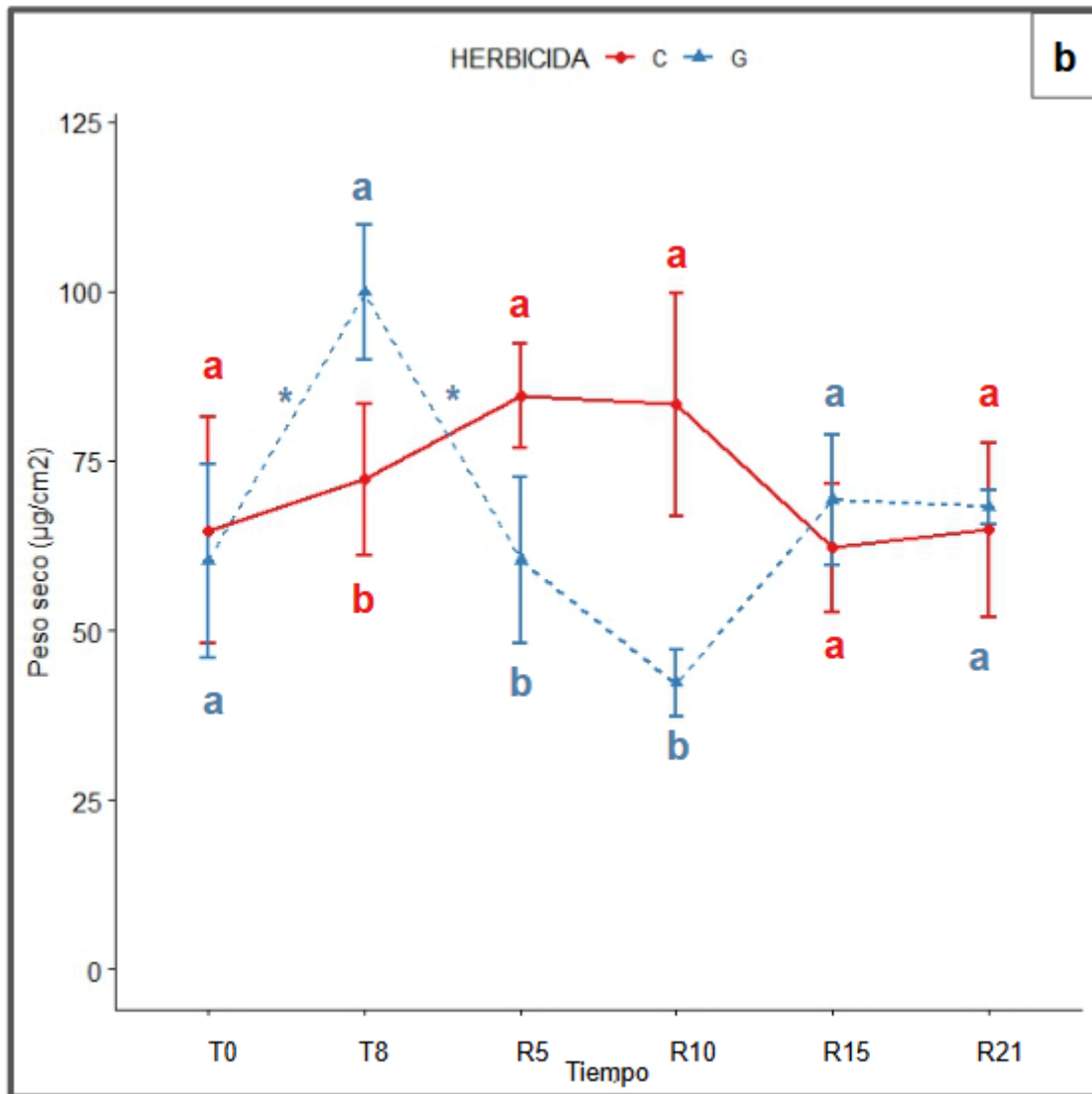


**Figura 4.1.** Concentración de clorofila a perifítica en función de los tiempos de exposición y recuperación para (a) P1 y (b) P2. Datos presentados como media  $\pm$  1 desvío estándar para todos los tratamientos a lo largo de los periodos de exposición (inmediatamente después y 8 días posteriores al agregado de glifosato: T0 y T8, respectivamente) y recuperación (luego de 5, 10, 15 y 21 días en agua libre de herbicida: R5, R10, R15 y R21, respectivamente). Las variables fueron analizadas mediante un modelo lineal general con herbicida y tiempo como efectos fijos, las comunidades (P1 y P2) fueron analizadas por separado. Cuando la interacción entre los factores fue significativa: las diferencias significativas entre los tratamientos C y G dentro de un mismo tiempo se indican con letras distintas, y las diferencias significativas entre tiempos consecutivos se indican con un asterisco del mismo color del tratamiento. P1 = perifiton de un mes de colonización, P2 = perifiton de dos meses de colonización, C = control, G = sal monoisopropilamina de glifosato.

El promedio del peso seco, para ambos tratamientos juntos, para la comunidad P1 a tiempo inicial fue  $30,99 \pm 0,82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . El promedio para P2 fue  $62,50 \pm 1,70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , valor significativamente mayor que el peso seco de P1 (test-t, p-valor=0.002183). Para esta variable se detectaron diferencias significativas en la interacción entre los factores tratamiento y tiempo en ambas comunidades (MLG, P1: p-valor=0,001066; P2: p-valor=0,0004534). A los 8 días de la exposición, la magnitud del efecto del glifosato sobre el peso seco no mostró diferencias estadísticamente significativas entre P2 y P1 (test-t, p-valor=0,7217). En ambas comunidades, se registró un aumento significativo entre los valores iniciales de peso seco y el T8 con glifosato, generando valores de PS significativamente mayores en el tratamiento con herbicida respecto al control (*Figura 4.2*). Luego de que la comunidad P1 que fue expuesta a glifosato haya sido translocada a un medio sin herbicida, no se encontraron diferencias significativas entre el peso seco del tratamiento control y el expuesto a glifosato en R5, ni en los tiempos posteriores. El peso seco de la comunidad P2 disminuyó significativamente a R5 hasta valores medios por debajo de los controles. En esta comunidad, no se observaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con herbicida recién en R15 y R21 .

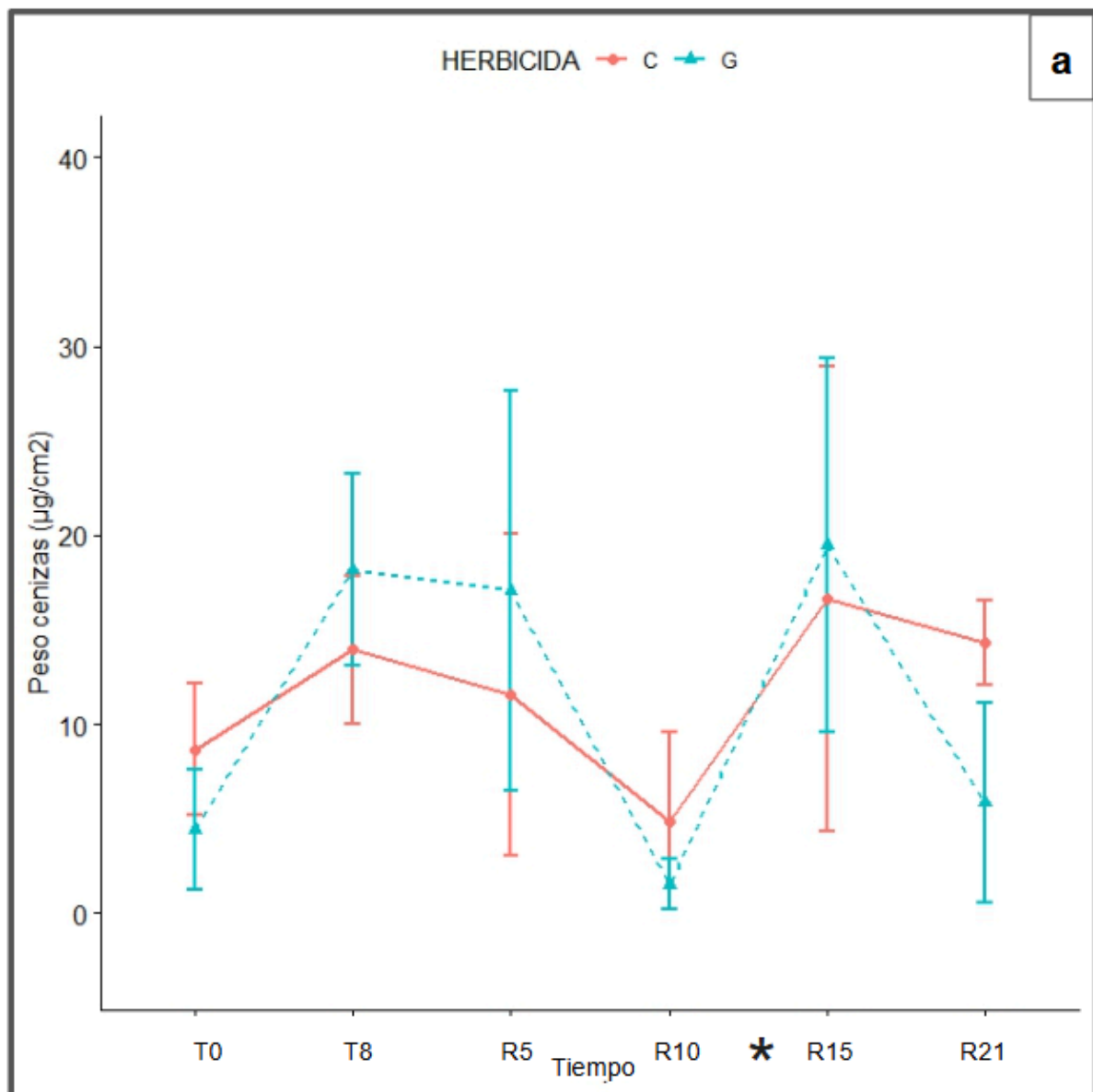


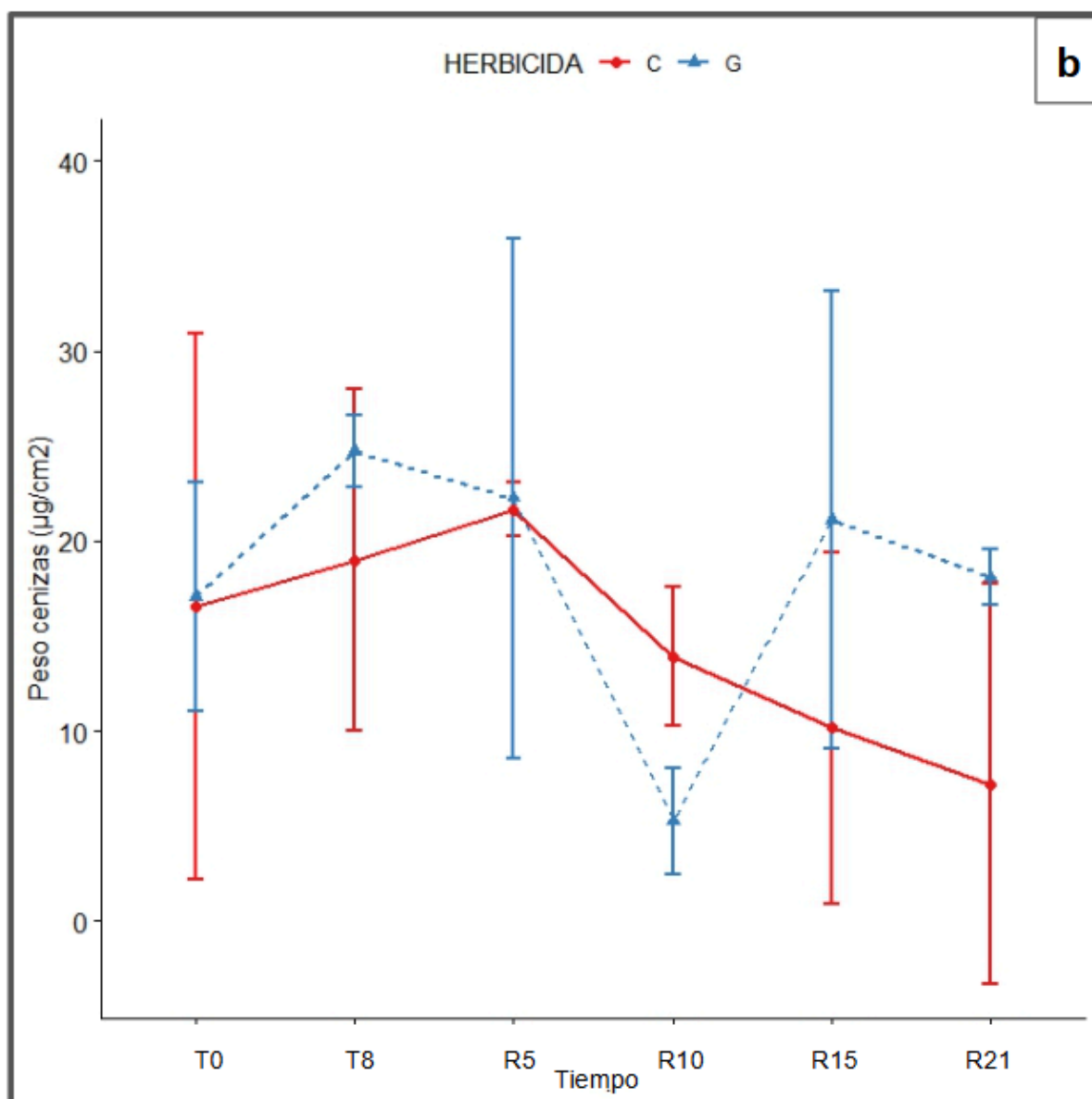




**Figura 4.2.** Peso seco del perifiton en función de los tiempos de exposición y recuperación para (a) P1 y (b) P2. Datos presentados como media  $\pm$  1 desvío estándar para todos los tratamientos a lo largo de los periodos de exposición (inmediatamente después y 8 días posteriores al agregado de glifosato: T0 y T8, respectivamente) y recuperación (luego de 5, 10, 15 y 21 días en agua libre de herbicida: R5, R10, R15 y R21, respectivamente). Las variables fueron analizadas mediante un modelo lineal general con herbicida y tiempo como efectos fijos, las comunidades (P1 y P2) fueron analizadas por separado. Cuando la interacción entre los factores fue significativa: las diferencias significativas entre los tratamientos C y G dentro de un mismo tiempo se indican con letras distintas, y las diferencias significativas entre tiempos consecutivos se indican con un asterisco del mismo color del tratamiento. P1 = perifiton de un mes de colonización, P2 = perifiton de dos meses de colonización, C = control, G = sal monoisopropilamina de glifosato.

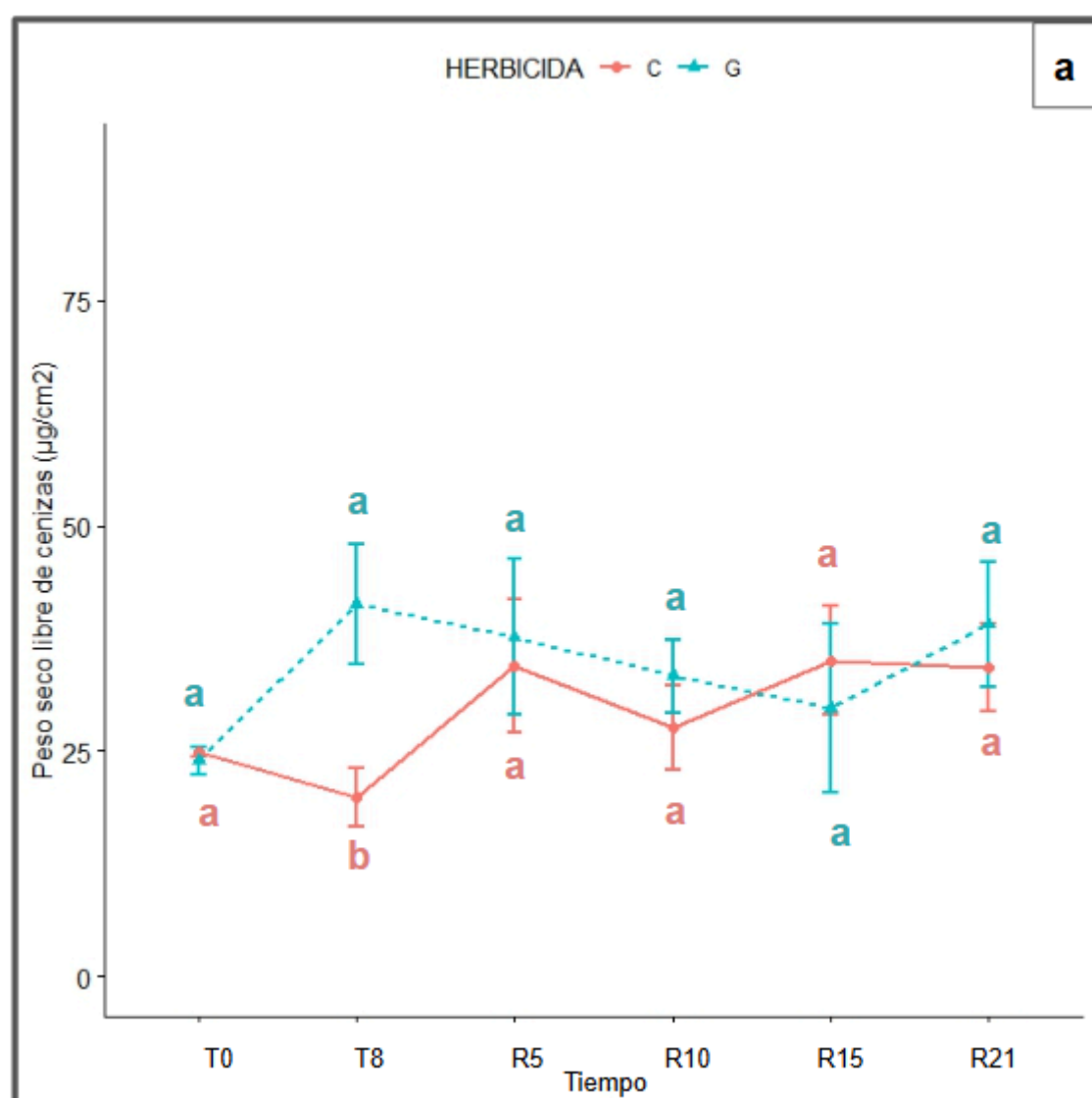
El valor medio de cenizas para cada comunidad, en cada tiempo y tratamiento herbicida se presentan en la *Figura 4.3*. Al iniciar el estudio (T0), el promedio de las cenizas para el perifiton con 1 mes de desarrollo fue de  $6,55 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (ambos tratamientos juntos) y para P2 el valor medio fue mayor ( $16,80 \pm 5,88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas, aunque con un p-valor marginal (test-t, p-valor=0.05213). Según los resultados del MLG, solo se registraron diferencias significativas en las cenizas de la comunidad P1 para el factor tiempo (p-valor=0,005853), con un aumento significativo entre R10 y R15.

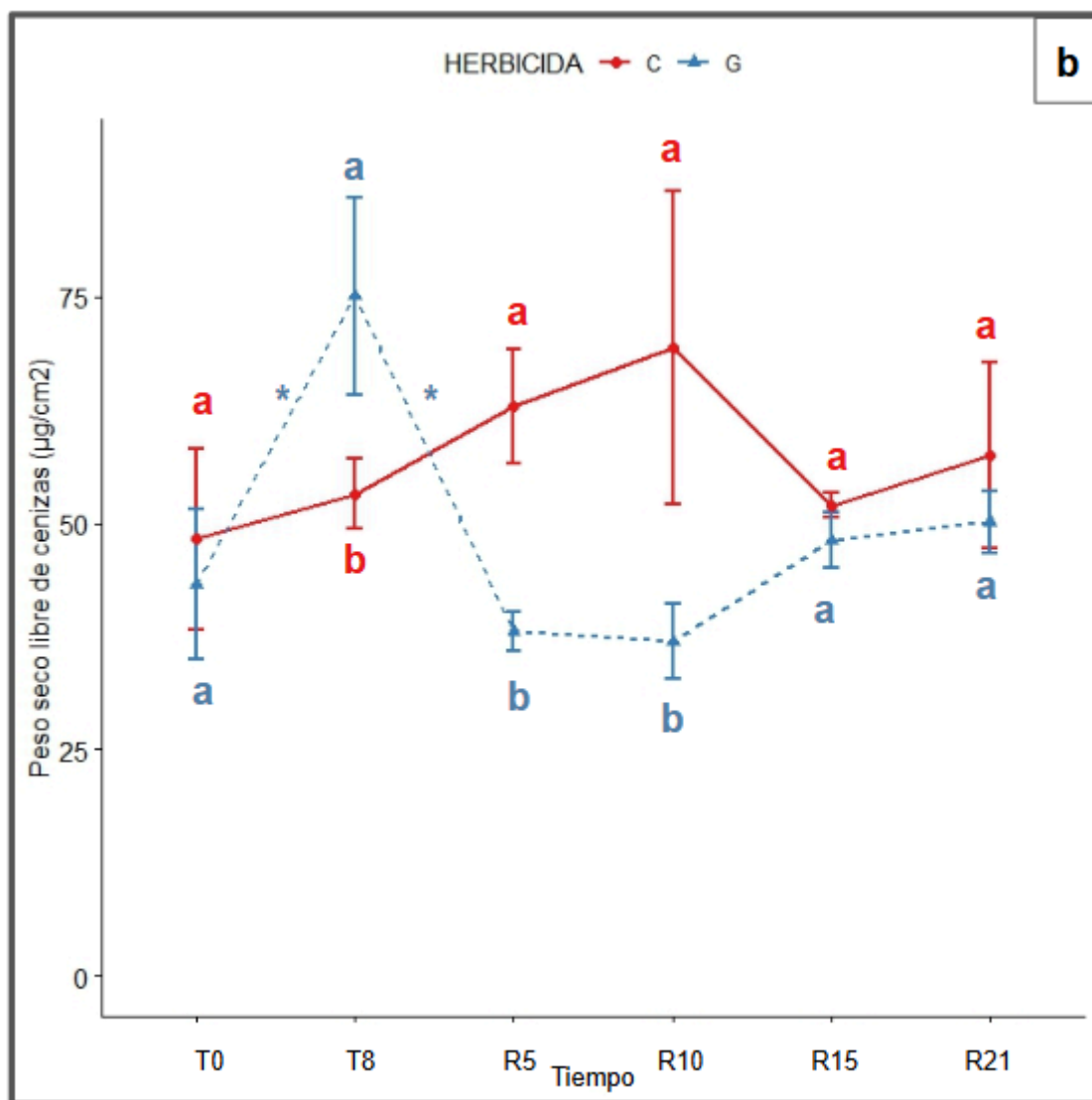




**Figura 4.3.** Cenizas del perifiton en función de los tiempos de exposición y recuperación para (a) P1 y (b) P2. Datos presentados como media  $\pm$  1 desvío estándar para todos los tratamientos a lo largo de los periodos de exposición (inmediatamente después y 8 días posteriores al agregado de glifosato: T0 y T8, respectivamente) y recuperación (luego de 5, 10, 15 y 21 días en agua libre de herbicida: R5, R10, R15 y R21, respectivamente). Las variables fueron analizadas mediante un modelo lineal general con herbicida y tiempo como efectos fijos, las comunidades (P1 y P2) fueron analizadas por separado. Cuando la interacción entre los factores no fue significativa y hubo diferencias significativas únicamente en el factor tiempo: estas diferencias entre tiempos consecutivos se indican con un asterisco en el eje x. P1 = perifiton de un mes de colonización, P2 = perifiton de dos meses de colonización, C = control, G = sal monoisopropilamina de glifosato.

A T0, el peso seco libre de cenizas medio para la comunidad P1 fue  $24,45 \pm 0,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (promediando los tratamientos C y G), mientras que para P2 el valor ( $45,71 \pm 1,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) fue significativamente mayor (test-t, p-valor=0,001689). Se detectaron diferencias significativas en la interacción tratamiento-tiempo para esta variable para ambas comunidades (MLG, P1: p-valor=0,01528; P2: p-valor=0,0001315). El PSLC no reflejó diferencias significativas entre los microcosmos C y G a T0, tanto para P1 como para P2 (*Figura 4.4*). Mientras que a T8, los tratamientos con herbicida presentaron un aumento que resultó en un peso mayor que el del control, para P1 y P2. La magnitud del efecto del glifosato sobre el peso seco libre de cenizas del perifiton P2 no difirió significativamente de la de P1 a T8 (test-t, p-valor=0,6223). A los 5 días del periodo de recuperación, disminuyeron drásticamente los valores de PSLC para la comunidad con 2 meses de colonización que había sido expuesta al glifosato, registrándose valores muy inferiores al control en R5 y R10 (*Figura 4.4b*). A partir de R15, no se obtuvieron diferencias entre C y G para P2. En cambio, para P1, la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo de muestreo se obtuvieron a partir de R5 hasta el final del experimento. A lo largo de todo el período de estudio, esta variable, tanto para P1 como para P2 en los microcosmos control, no presentó diferencias en el tiempo entre muestreos consecutivos.





**Figura 4.4.** Peso seco libre de cenizas del perifiton en función de los tiempos de exposición y recuperación para (a) P1 y (b) P2. Datos presentados como media  $\pm$  1 desvío estándar para todos los tratamientos a lo largo de los periodos de exposición (inmediatamente después y 8 días posteriores al agregado de glifosato: T0 y T8, respectivamente) y recuperación (luego de 5, 10, 15 y 21 días en agua libre de herbicida: R5, R10, R15 y R21, respectivamente). Las variables fueron analizadas mediante un modelo lineal general con herbicida y tiempo como efectos fijos, las comunidades (P1 y P2) fueron analizadas por separado. Cuando la interacción entre los factores fue significativa: diferencias significativas entre los tratamientos C y G dentro de un mismo tiempo se indican con letras distintas, y las diferencias significativas entre tiempos consecutivos, se indican con un asterisco del mismo color del tratamiento. P1 = perifiton de un mes de colonización, P2 = perifiton de dos meses de colonización, C = control, G = sal monoisopropilamina de glifosato.

El índice autotrófico (IA) se calcula como el cociente entre el PSLC y la concentración de clorofila *a* (Lowe y Pan 1996; APHA 2005). Los valores medios de IA para cada tiempo, comunidad y tratamiento herbicida se detallan en la *Tabla 4.3*.

	PERIFITON	P1		P2	
	HERBICIDA	C	G	C	G
	TIEMPO	C_P1	G_P1	C_P2	G_P2
<b>IA</b> (PSLC/Chl <i>a</i> )	<b>T0</b>	845±287	789±179	605±192	506±165
	<b>T8</b>	574±151	481±52	1029±102	588±79
	-----	-----	-----	-----	-----
	<b>R5</b>	841±340	696±248	<b>1016±33</b> *	<b>384±59</b>
	<b>R10</b>	685±256	877±228	<b>1384±410</b> *	<b>324±60</b>
	<b>R15</b>	646±100	548±144	828±235	773±177
	<b>R21</b>	573±90	634±231	884±253	656±59

**Tabla 4.3.** Índice autotrófico (IA) del perifiton P1 y P2 para cada tratamiento durante los períodos de exposición (T0-T8) y recuperación (R0-R21). Se presentan los valores medios ± 1 desvío estándar. La variable fue analizada mediante un modelo lineal general con herbicida y tiempo como efectos fijos, las comunidades (P1 y P2) fueron analizadas por separado. Cuando la interacción entre los factores fue significativa: las diferencias entre C y G dentro de un mismo tiempo se indican con los valores en negrita, y las diferencias entre tiempos consecutivos dentro de un mismo tratamiento se indican con un asterisco. P1 = perifiton de un mes de colonización, P2 = perifiton de dos meses de colonización, C = control, G = sal monoisopropilamina de glifosato. Tiempos de muestreo: inmediatamente después (T0) y 8 días después (T8) del agregado de glifosato, y a los 5, 10, 15 y 21 días luego de la translocación de los sustratos colonizados a un medio sin herbicida (R5, R10, R15 y R21, respectivamente).



Los valores medios del IA para ambas comunidades en todos los tiempos, tanto en el control como en presencia de glifosato, fueron superiores a 200, valor sobre el cual se considera que las comunidades presentan una alta proporción de organismos heterotróficos, no clorofílicos o una alta presencia de detritos orgánicos. Para la comunidad con un mes de colonización (P1), el valor medio máximo de IA se obtuvo en los vasos con glifosato en el periodo de recuperación R10 ( $877 \pm 228$ ), mientras que el mínimo se observó en el mismo tratamiento en T8 ( $481 \pm 52$ ). En contraste, la comunidad con dos meses de colonización (P2) alcanzó su máximo en el control durante R10 ( $1384 \pm 410$ ), y su valor mínimo ocurrió también en R10 pero en el tratamiento con glifosato ( $324 \pm 60$ ). En el perifiton P1 no hubo diferencias significativas entre los valores medios de IA para la interacción entre los factores, ni para el tiempo o los tratamientos herbicida. En cambio, en P2 se registraron diferencias significativas en la interacción herbicida-tiempo ( $p\text{-valor}=0,0006772$ ). El IA del perifiton P2 sometido al herbicida no difirió significativamente en el tiempo a lo largo de todo el estudio. En cambio, la comunidad del tratamiento control presentó un aumento del IA entre R5 y R10, y una disminución entre R10 y R15 (*Tabla 4.3*). Los menores valores promedio de este índice registrados en R5 y R10 en el perifiton P2 sometido a glifosato mostraron diferencias significativas con los altos valores registrados en el control a esos tiempos de recuperación. A tiempo inicial, el promedio del IA para P1 (ambos tratamientos juntos) fue significativamente mayor que el de P2 (test-t,  $p\text{-valor}=0,04369$ ). En cuanto a la magnitud del efecto del glifosato sobre el índice autotrófico a T8, difirió significativamente entre P1 y P2, siendo mayor en la comunidad más madura (test-t,  $p\text{-valor}=0,005811$ ).

## 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En esta tesis evaluamos los efectos del glifosato, en su forma de sal monoisopropilamina, sobre dos comunidades de perifiton con distinto tiempo de desarrollo sobre sustratos artificiales y su posterior capacidad de recuperación utilizando microcosmos en condiciones controladas y libres de herbicida. Nuestros resultados más importantes indican que ambas comunidades perifíticas, independientemente del tiempo de colonización sobre los sustratos, fueron vulnerables al glifosato durante el período de exposición. Y que durante el período de recuperación en agua libre de herbicida, las variables estudiadas de las comunidades impactadas lograron recuperarse a niveles control, siendo la recuperación más rápida en el perifiton con menor tiempo de desarrollo sobre los sustratos.

### 5.1. Periodo de exposición

#### *Variables del agua*

La temperatura de la cámara estaba controlada, por lo tanto, el agua en los microcosmos se mantuvo en un rango constante durante todo el experimento. Este rango térmico se correspondió con las condiciones promedio del mesocosmos experimental durante la colonización de las comunidades perifíticas.

El glifosato fue añadido a las unidades experimentales inmediatamente antes de tomar las muestras de agua a T0. Por lo tanto, el incremento de fósforo total registrado en los microcosmos tratados con glifosato resulta esperable, dado que se trata de un herbicida organofosforado. El efecto eutrofizante del glifosato en sistemas de agua dulce, derivado del aumento de fósforo en el medio, que actúa como fuente de nutrientes y estimula el crecimiento de organismos fotosintéticos, ha sido documentado en varios estudios (Austin et al. 1991, Vera et al. 2010, Pérez et al. 2011). Este exceso de nutrientes puede provocar un desequilibrio ecológico, caracterizado por una disminución de la biodiversidad y el crecimiento desproporcionado de unos pocos organismos tolerantes o resistentes (Vera et al. 2010).

Los vasos con agua y perifiton se dejaron aclimatar a las condiciones experimentales de luz y temperatura durante 48 horas antes del inicio del ensayo. El agua, proveniente del tanque al aire libre, utilizada en estos microcosmos había sido previamente filtrada y autoclavada antes de incorporar los sustratos colonizados, por lo que se esperaba que estuviera libre de

organismos. Sin embargo, las muestras de agua recolectadas a T0 mostraron concentraciones de clorofila *a* planctónica distintas de cero, lo que evidencia la presencia de organismos fotosintéticos en el agua de las unidades experimentales. Es posible que este desplazamiento de organismos desde el perifiton hacia la columna de agua durante la aclimatación esté relacionado con el aprovechamiento de los recursos disponibles en un medio aún libre de contaminante.

El incremento significativo de la turbidez, entre el inicio y los 8 días del experimento en los tratamientos con glifosato, puede asociarse con el incremento de partículas suspendidas, microorganismos y material orgánico e inorgánico en la columna de agua luego del agregado del herbicida. El aumento en los detritos podría ser consecuencia del efecto tóxico del glifosato, que provoca la muerte de diversos organismos susceptibles y su posterior descomposición. Por otro lado, el incremento de los microorganismos podría deberse a la migración y desarrollo de organismos capaces de metabolizar el herbicida, como las cianobacterias (Forlani et al. 2008), que se desplazan desde la matriz perifítica hacia el medio circundante. La migración de estos organismos fotosintéticos explicaría el incremento en la concentración de clorofila *a* en el agua de las unidades experimentales a T8 con respecto a T0. Estos resultados son consistentes con estudios previos en microcosmos que reportan un aumento en la turbidez y en la clorofila *a* planctónica tras la exposición al glifosato, tanto en formulaciones comerciales como en su forma pura (Vera et al. 2012, Gonzalez et al. 2019, Bernini 2022). Sin embargo, el incremento de turbidez y clorofila *a* en el agua también lo observamos en los controles. En esos microcosmos, los organismos que son capaces de migrar se verían favorecidos por la falta de competencia por los recursos en la columna de agua.

La reducción del oxígeno disuelto en los tratamientos con herbicida puede deberse al metabolismo acelerado de organismos oportunistas que son capaces de degradar el glifosato (Carles et al. 2019). Mientras que el efecto nocivo del herbicida, que conlleva al incremento de materia orgánica en descomposición en el medio, puede también aportar a la disminución en la concentración de oxígeno disuelto (Gustavson et al. 2003) y provocar el incremento en la conductividad obtenido a T8 (Kersting 1994). Otros estudios han reportado cambios en la conductividad asociados a la presencia del herbicida en ecosistemas acuáticos (Pesce et al. 2009) y microcosmos de laboratorio (Vera y Trinelli 2021, Bernini 2022). Sin embargo, el aumento en la conductividad y la disminución del oxígeno disuelto fueron registrados también en las unidades control sin presencia del herbicida.

### *Variables perifíticas*

Como esperábamos inicialmente, el perifiton establecido sobre los sustratos por un periodo de tiempo más prolongado (P2) mostró los valores más altos de peso seco, cenizas, peso seco libre de cenizas y clorofila *a*, resultado consistente con que una comunidad con un período de colonización mayor tiene mayor biomasa (Khadra et al. 2018), si no se enfrenta con algún fenómeno que remueva, total o parcialmente, la matriz del sustrato.

En ambas comunidades observamos un aumento en todas las variables de masa del perifiton estudiadas con el agregado de glifosato a T8 en comparación con el día 0. Este resultado es contrario a lo que podría esperarse intuitivamente, dado que el glifosato es un herbicida diseñado para inhibir la síntesis de aminoácidos esenciales en plantas, ejerciendo un efecto negativo sobre las mismas. En este sentido, varios estudios han documentado una disminución en las variables de masa del perifiton tras la exposición al herbicida. Por ejemplo, Vera et al. (2010) reportaron una disminución de la concentración de clorofila *a* perifítica al aplicar una concentración de 8 mg/L de Roundup en mesocosmos de gran volumen al aire libre. Sin embargo, también existen investigaciones, como la presente tesis, que reportan un aumento de dichas variables. Vera et al. (2012) registraron un incremento en la biomasa y la clorofila *a* del perifiton como consecuencia del agregado de 3,5 mg/L de Glifosato Atanor en microcosmos al aire libre. Mientras que Vera y Trinelli (2021) obtuvieron un aumento de las variables de masa perifíticas con 0,4 y 4 mg/L del ingrediente activo en microcosmos de laboratorio. Por su parte, Guasch et al. (2016) destacaron que el estrés químico puede favorecer la proliferación de organismos autotróficos oportunistas, aumentando transitoriamente la biomasa del perifiton.

Varios autores han sugerido que estas respuestas contrastantes entre estudios pueden estar relacionadas con diferencias en el diseño experimental, como el uso de condiciones controladas o al aire libre, las características físicas y químicas del medio, diferencias morfométricas en las unidades experimentales, el tipo y concentración de glifosato empleado, el tiempo de exposición, entre otros factores (Pérez et al. 2007, Vera et al. 2012, Lozano et al. 2018, Gonzalez et al. 2019, Sabio y García et al. 2020, Vera y Trinelli 2021). Además, las respuestas pueden depender de las características intrínsecas de las comunidades, como su composición inicial (Pesce et al. 2009) o su exposición previa al contaminante (Wood et al. 2017, Fugère et al. 2020). No obstante, independientemente del diseño experimental o de las particularidades del perifiton, es evidente que este herbicida impacta en la estructura y función de las comunidades perifíticas.

El glifosato no afecta por igual a todas las especies que conforman el ensamble perifítico, ya que cada grupo de organismos responde de forma diferencial según su tolerancia fisiológica y ecológica (Pesce et al. 2009, Guasch et al. 2016, Lozano et al. 2018, Gonzalez et al. 2019). Algunas especies pueden ser más resistentes o tolerantes al herbicida. Gattás et al. (2016) reportaron que las clorofitas fueron favorecidas en mesocosmos al aire libre con el agregado de 6 mg/L de Roundup Max® o el ingrediente activo del formulado. También fue ampliamente documentado el incremento de las cianobacterias con presencia de glifosato en el medio (Pérez et al. 2007, Vera et al. 2010, 2012, Vera y Trinelli 2021). En este grupo existen ciertos organismos que poseen distintas estrategias para contrarrestar el efecto negativo del glifosato mediante la sobreexpresión de la 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetasa o la expresión de una enzima alternativa tolerante al glifosato (Powell et al. 1991, 1992, Forlani et al. 2008, 2015). Por otro lado, otras especies se ven negativamente afectadas por este contaminante, como ser las diatomeas (Pérez et al. 2007, Gonzalez et al. 2019, Vera y Trinelli 2021). A pesar de lo mencionado más arriba que fue reportado por Gattás et al. (2016), otros autores han visto a las clorofitas como un grupo sensible al herbicida a una concentración de 3 mg/L en microcosmos (Gonzalez et al. 2019). De acuerdo a su mecanismo principal de acción, el glifosato puede provocar mortalidad de las especies más sensibles, y las que sobreviven pueden aprovechar los recursos disponibles para crecer y reproducirse, generando un aumento en la biomasa total. Aunque en esta tesis no se llevó a cabo la identificación ni el recuento de organismos, es razonable suponer que la exposición al contaminante ha generado cambios en la composición y abundancia de las especies que integran las comunidades. Esto se debe a las diferencias en la sensibilidad de los organismos al glifosato, lo que probablemente ha provocado una alteración en la estructura y función de dichas comunidades (Lüring et al. 2015, Khadra et al. 2018).

En varias ocasiones se ha observado que los contaminantes químicos, incluidos los herbicidas, pueden actuar como factores de estrés subletal que estimulan el crecimiento de las plantas o algas en bajas concentraciones. Este fenómeno es conocido como efecto hormético, donde una dosis baja o subletal de un tóxico estimula el crecimiento antes de causar efectos inhibitorios o letales a mayores concentraciones (Calabrese y Baldwin 2003). Según una revisión bibliográfica de trabajos científicos relacionados con los efectos del glifosato sobre la concentración de clorofila *a* en perifiton, en el rango entre los 6 µg/L (Khadra et al. 2018) y los 6 mg/L de glifosato (Iummato et al. 2017) se registraron aumentos significativos en la clorofila *a*, mientras que con concentraciones mayores del herbicida las concentraciones de clorofila *a* fueron menores con respecto a los controles (Vera com. pers.). Por lo tanto, esto sugiere que la concentración de glifosato que utilizamos en el

experimento (0,4 mg/L) está dentro del rango subletal, y que la media máxima de clorofila *a* perifítica en T8 puede interpretarse como un intento de sobrecompensación ante el estrés inducido por el herbicida. Este fenómeno de hormesis también ha sido reportado por Iummato et al. (2017) relacionado con un aumento del peso seco y el peso seco libre de cenizas en perifiton expuesto a glifosato.

En última instancia, el aumento en el peso seco, cenizas, peso seco libre de cenizas y clorofila *a* en las comunidades perifíticas expuestas al glifosato podría deberse a una combinación de estos factores. La proliferación de especies tolerantes o resistentes al herbicida, o de aquellas que, al ser menos susceptibles, aprovechan el aumento de recursos por la muerte de organismos sensibles, y los efectos subletales que estimulan el crecimiento a esta concentración. Todo esto pone de manifiesto la complejidad ecológica de las comunidades perifíticas, las cuales pueden responder de formas variadas e inesperadas a las perturbaciones, lo que podría tener implicancias importantes para la gestión de ecosistemas acuáticos en áreas agrícolas.

Según Peterson y Stevenson (1992), las comunidades más jóvenes suelen ser más vulnerables pero más resilientes, mientras que las comunidades más maduras tienden a ser más resistentes, aunque menos capaces de recuperarse rápidamente tras una perturbación. Basándonos en este marco, en nuestro estudio esperábamos que el perifiton con menor período de colonización (P1) mostrara una mayor susceptibilidad al glifosato, evidenciada por una mayor magnitud de efecto del contaminante sobre su biomasa. Esta mayor sensibilidad podría atribuirse a la menor madurez de la comunidad y a la estructura menos compleja de la matriz perifítica, que permitiría una mayor exposición de los organismos al herbicida (Guasch et al. 2016). Por el contrario, esperábamos que el perifiton con 2 meses de colonización (P2), al ser una comunidad más madura, presentara una matriz más densa capaz de actuar como barrera protectora contra la penetración del herbicida (Hill et al. 1997). Sin embargo, en este trabajo de tesis no encontramos diferencias significativas en las magnitudes de efecto del glifosato sobre ninguna de las variables perifíticas entre ambas comunidades a T8. Esto sugiere que, tras 8 días de exposición, no hay diferencias detectables en la tolerancia al glifosato entre comunidades que difieren solo en un mes de colonización. Es posible que un mes de diferencia en el tiempo de colonización no sea suficiente para generar diferencias apreciables en la resistencia al herbicida. Estas diferencias podrían ser más evidentes si los periodos de colonización fueran más contrastantes (Khadra et al. 2018). Alternativamente, también es posible que una resistencia diferencial entre P1 y P2 pudiera manifestarse con un periodo de exposición al glifosato más corto.

Según Matthews et al. (1980), los cambios en la relación entre autótrofos y heterótrofos están asociados con cambios estructurales y funcionales de las comunidades microbianas. El índice autotrófico (peso seco libre de cenizas / concentración de clorofila *a* perifítica), permite evaluar la proporción algal presente en la biomasa orgánica total del perifiton, ya que compara la componente autotrófica con la heterotrófica representada por bacterias, hongos, protistas heterótrofos, microinvertebrados y restos de materia orgánica en degradación (Bicudo 1990). Los valores medios de índice autotrófico superiores a 200 obtenidos para ambas comunidades, tanto en los controles como en presencia de glifosato, indican que la componente orgánica del perifiton está compuesta principalmente por organismos heterotróficos, no clorofílicos, y/o una acumulación significativa de detritos orgánicos en la matriz (Lowe y Pan 1996), y que este balance no se vió modificado por la exposición al herbicida. Trabajos previos en sistemas impactados plantean que la exposición a contaminantes puede favorecer la proliferación de organismos heterotróficos a expensas de los autótrofos, como microalgas y cianobacterias (Matthews et al. 1980, Pesce et al. 2009, Guasch et al. 2016). Y que una mayor mortandad de estos organismos fotosintéticos por efecto tóxico del contaminante tendría como consecuencia el aumento en la proporción de los detritos, un fenómeno descrito ampliamente en comunidades expuestas a perturbaciones químicas (Guasch et al. 2016).

## 5.2. Periodo de recuperación

### *Variables del agua*

El incremento significativo de turbidez y del fósforo total en las unidades experimentales previamente tratadas con glifosato, podría estar relacionado con la migración de organismos desde el biofilm, el cual aún podría contener glifosato acumulado en su matriz (Beecraft y Rooney 2021), hacia el medio sin herbicida. Esta migración hacia un medio con mejores condiciones fue reportado previamente en estudios de recuperación con distintos contaminantes (Lambert et al. 2012, Morin et al. 2012, Vera y Trinelli 2021, Bernini 2022).

Durante el periodo de recuperación, también se observó un aumento significativo en la concentración de clorofila *a* planctónica en los tratamientos que habían sido previamente expuestos al glifosato. Este incremento sugiere que la migración de organismos hacia la columna de agua, descrita en el párrafo anterior, incluye al menos en parte organismos fotosintéticos. Esta hipótesis fue previamente planteada por Vera y Trinelli (2021) y corroborada por Bernini (2022), quienes también documentaron el desplazamiento de

organismos como una respuesta de recuperación a la exposición al glifosato. El patrón de aumento progresivo de clorofila *a* en los tratamientos con glifosato durante la recuperación, ha sido observado en estudios donde las especies tolerantes al glifosato muestran una proliferación descontrolada tras una exposición prolongada (Székács y Darvas 2012).

En los controles se observó un aumento gradual en los niveles de turbidez, fósforo total y clorofila *a* planctónica, con diferencias significativas únicamente al final del período de recuperación en comparación con R0. Esto sugiere que, incluso en ausencia de exposición al contaminante, también ocurre un desplazamiento de organismos hacia la columna de agua, posiblemente para aprovechar los nuevos recursos disponibles en el medio.

El aumento en la concentración de oxígeno disuelto a R5 en todas las unidades experimentales podría explicarse por un incremento en la fotosíntesis y la proliferación de los organismos en un medio renovado, rico en nutrientes y libre tanto de herbicida como de competencia. La ausencia de diferencias significativas entre C y G en los valores de oxígeno disuelto sugiere una recuperación de la actividad fotosintética en los organismos del perifiton que habían sido previamente afectados por el herbicida. Sin embargo, hacia el final del experimento, los vasos con P2 mostraron una disminución y la persistencia de valores bajos de oxígeno disuelto. Esto podría indicar un impacto prolongado del herbicida, como se ha reportado previamente en sistemas con glifosato residual (Pesce et al. 2009).

### *Variables perifíticas*

El índice autotrófico no solo es utilizado como un indicador de estabilidad estructural y funcional, sino que también se lo incorpora en evaluaciones de la capacidad de recuperación en comunidades microbianas (Matthews et al. 1980). Durante el período de recuperación, la comunidad más madura (P2) sufrió una alteración en el balance entre autótrofos y heterótrofos, con posibles implicancias en la dinámica estructural y funcional del perifiton, que no se registró en P1. El perifiton P2 que había estado expuesto a glifosato presentó valores de IA mucho menores que el control, lo que podría indicar un crecimiento de organismos autótrofos y/o la disminución de los heterótrofos. Las diferencias observadas entre ambas comunidades destacan la importancia de la madurez de la comunidad en la capacidad de recuperación frente a los impactos de contaminantes (Guasch et al. 2016).

Ambas comunidades perifíticas, sin historia previa de exposición al glifosato, lograron recuperar sus características a los valores control en un medio libre de herbicida tras haber estado expuestas 8 días a 0,4 mg/L de sal monoisopropilamina de glifosato. Nuestros



resultados coinciden con estudios previos realizados con perifiton expuesto durante 7 días a concentraciones similares de ingrediente activo, 0,4 mg/L (Vera y Trinelli 2021) y 0,3 mg/L (Bernini 2022). En estos trabajos, las variables del perifiton se recuperaron a los 7 y 10 días, respectivamente, tras el periodo de recuperación en agua libre de herbicida. En esta tesis, se incorporó un tiempo de muestreo más temprano, a los 5 días de la translocación, para evaluar si la recuperación podría ocurrir aún más rápidamente.

Luego de la translocación al medio libre de glifosato, la comunidad con menor tiempo de desarrollo sobre los sustratos artificiales (P1) mostró una notable capacidad de recuperación, restaurando las variables estudiadas a los 5 días del periodo de recuperación. Además, no se observaron diferencias significativas entre los controles y los microcosmos G en los tiempos posteriores (R10, R15 y R21). Este resultado evidencia una alta resiliencia de las comunidades jóvenes frente al estrés químico, respaldando estudios previos que sugieren que comunidades perifíticas más jóvenes, al tener una matriz menos densa y menos compleja, pueden regenerarse rápidamente tras la eliminación del estrés (Sabater et al. 2007). En contraste, la comunidad más madura (P2) presentó un periodo de recuperación más prolongado, alcanzando la recuperación recién a los 15 días de la translocación. Esto podría atribuirse a que las comunidades más establecidas tienden a acumular mayores cantidades de contaminantes en su matriz (Lawrence et al. 2001, Beecraft y Rooney 2021), lo que afecta de forma diferencial a los organismos que las componen y requieren un tiempo adicional para su completa recuperación.

Por otro lado, otras investigaciones sobre recuperación del perifiton tras la exposición a herbicidas han mostrado resultados opuestos a los nuestros. Por ejemplo, en el perifiton del Lago Erken, expuesto al herbicida diflufenican durante 12 días, los valores de clorofila *a* no se restauraron rápidamente luego del periodo de recuperación en un medio libre de herbicidas (Feckler et al. 2018). Estas discrepancias pueden atribuirse a la complejidad del perifiton, cuya respuesta es específica al tipo de estrés sufrido, y además está influenciada por otros factores. Entre ellos se encuentran el contexto físico y químico del medio donde se desarrollan y están inmersas las comunidades (Steinman y McIntire 1990), las interacciones con otras comunidades, el tipo de contaminante, su concentración y tiempo de exposición (Gustavson et al. 2003), así como el parámetro utilizado para evaluar la recuperación (Dorigo et al. 2010). Además, factores intrínsecos de las comunidades, como su composición, la historia de estrés previo a contaminantes (Bonnineau et al. 2021) y la madurez y espesor del biofilm (Dorigo et al. 2010), también pueden influir en sus respuestas de recuperación. La presente tesis confirma que ambas comunidades perifíticas, que presentan diferencias iniciales en biomasa, exhiben respuestas distintas en términos de

resiliencia frente a la exposición al glifosato. Mientras las comunidades más maduras requieren más tiempo para recuperarse, las comunidades jóvenes lo hacen de forma más rápida. Estos hallazgos subrayan la importancia de adoptar enfoques de manejo que consideren la dinámica comunitaria y temporal para minimizar el impacto del glifosato en los ecosistemas acuáticos.

Estudios sobre el impacto del glifosato en ecosistemas acuáticos han demostrado efectos perjudiciales a largo plazo como consecuencia de la exposición crónica a concentraciones subletales de este herbicida, afectando tanto la estructura de las comunidades como los procesos biogeoquímicos de los cuerpos de agua (Lüring et al. 2015). En contraste, nuestros resultados aportan evidencia de cómo diferentes etapas del desarrollo de las comunidades perifíticas responden a una única aplicación de glifosato, lo que sugiere la existencia de ventanas temporales de oportunidad para la recuperación de los ecosistemas acuáticos, siempre que se elimine la presión del herbicida. No obstante, la exposición crónica al glifosato puede generar impactos acumulativos más severos en las comunidades, lo que plantea consecuencias importantes para el manejo sostenible de cuerpos de agua, particularmente en regiones agrícolas.

En resumen, en cuanto a las hipótesis planteadas en este trabajo, no corroboramos que (H1.1) las comunidades perifíticas con mayor tiempo de desarrollo (P2) mostraran una mayor resistencia frente al glifosato, en comparación con las de menor tiempo de colonización (P1). Por otro lado, se corroboró que (H2.1) ambas comunidades perifíticas, después de ser translocadas a un medio libre de glifosato, logran recuperar sus características a los valores control. Finalmente, se corroboró (H2.2) que las comunidades con mayor tiempo de desarrollo (P2) tuvieron un proceso de recuperación más lento en comparación con las comunidades más jóvenes (P1).

### 5.3. Conclusión

Distintos estudios han documentado diversas respuestas y factores que pueden regular la resistencia y la recuperación del perifiton ante la exposición al glifosato (Pesce et al. 2009, Guasch et al. 2016, Vera y Trinelli 2021, Bernini 2022). Estas respuestas están fuertemente influenciadas por el contexto ambiental y las trayectorias de recuperación específicas de cada comunidad después de la contaminación por glifosato. Paralelamente, la creciente preocupación por la presencia generalizada del glifosato en sistemas acuáticos ha

impulsado investigaciones sobre métodos para su remoción (Claude et al. 2017, Espinoza-Montero et al. 2020, Pereira et al. 2021, Yaah et al. 2024). Esto resalta la necesidad de continuar con estudios experimentales enfocados en el potencial de recuperación del perifiton para mejorar nuestra comprensión de las respuestas comunitarias y diseñar estrategias más efectivas de conservación y restauración de ecosistemas acuáticos.

Los resultados de este trabajo confirman la importancia del perifiton como bioindicador en estudios de ecotoxicología y revelan la complejidad de sus respuestas ante la exposición al glifosato. Ambas comunidades estudiadas demostraron capacidad de recuperar sus características tras la eliminación del herbicida, destacando la resiliencia inherente del perifiton en condiciones controladas. Sin embargo, nuestros hallazgos subrayan la importancia de considerar los tiempos de recuperación en el diseño de estrategias de restauración, especialmente dado que la exposición crónica o repetida, como ocurre en zonas agrícolas, podría exceder la capacidad de recuperación de las comunidades, conduciendo a la pérdida de biodiversidad y funcionalidad ecosistémica (Vera et al. 2010).

Finalmente, para abordar estas inquietudes, es crucial intensificar los estudios experimentales, desarrollar indicadores ecológicos robustos que integren métricas de resistencia y recuperación comunitaria para la evaluación de la salud ecosistémica, y promover prácticas de manejo sostenibles que reduzcan la exposición de los ecosistemas acuáticos a contaminantes como el glifosato.

#### 5.4 Consideraciones para un próximo experimento de resistencia y recuperación perifítica

Para futuros estudios que busquen profundizar en la resistencia y recuperación de comunidades perifíticas expuestas al herbicida glifosato, sería esencial incorporar algunos ajustes metodológicos que mejorarían la robustez y alcance de los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

- Aplicación de distintas concentraciones y formulaciones de glifosato

Esto permitiría investigar la relación dosis-respuesta, se propone aplicar un rango de concentraciones de glifosato, lo que podría arrojar información valiosa sobre los umbrales de toxicidad y los niveles en los que las comunidades pueden desarrollar mecanismos de resistencia o mostrar diferentes grados de vulnerabilidad. Dado que los efectos en los valores de clorofila *a*, peso seco y autotrofia/heterotrofia pueden variar en función de la

cantidad y el tipo de glifosato aplicado, esto permitirá una comprensión más detallada de los efectos subletales en las comunidades perifíticas.

- Aumento del tiempo de exposición y recuperación

Los resultados actuales sugieren que la respuesta perifítica diferencial para P1 y P2 podría depender de un periodo de exposición menor para observar respuestas más definidas y contrastantes. Además, la extensión del periodo de recuperación permitiría observar si las comunidades logran recuperar sus características originales, o si quedan secuelas a largo plazo tras la exposición al herbicida.

- Aumento del número de réplicas por tratamiento

Incluir un mayor número de réplicas incrementa el poder estadístico del análisis, reduciendo la variabilidad y mejorando la fiabilidad de las conclusiones. Esto es particularmente relevante dado que las fluctuaciones observadas entre comunidades (P1 y P2) y el comportamiento diferencial frente al herbicida pueden estar influenciados por factores no controlados que podrían mitigarse con un tamaño de muestra mayor.

- Incorporación de comunidades con distintos tiempos de crecimiento

Sumar comunidades perifíticas con distintos tiempos de desarrollo, además de los tiempos ya evaluados, permitiría una mejor comparación entre fases tempranas y tardías de colonización. Esto resultaría crucial para investigar si la resistencia aumenta con el tiempo de crecimiento o si existe un punto de estabilización a partir del cual la resistencia no aumenta. A su vez, se podría estudiar cómo el grado de complejidad estructural adquirido en las comunidades maduras puede influir en su capacidad de recuperación tras la exposición.

- Identificación de especies perifíticas

La identificación taxonómica de las especies que conforman el perifiton en los distintos tiempos de muestreo permitiría una mejor comprensión de cómo la composición comunitaria puede influir en los patrones de resistencia y recuperación. Este análisis podría revelar cambios funcionales en las comunidades relacionados con la producción primaria y la descomposición, proporcionando un indicador más del estado de salud y resiliencia del perifiton ante la exposición a contaminantes. Dado que diferentes especies pueden mostrar variaciones en su sensibilidad al glifosato, este análisis ayudaría a identificar aquellas especies clave que podrían actuar como bioindicadores de estrés ambiental.

#### - Estudios en condiciones naturales

En nuestro estudio se estudiaron comunidades perifíticas utilizando microcosmos en condiciones controladas de laboratorio. Aunque los resultados aportan valiosa información sobre la respuesta del perifiton al herbicida, deben interpretarse con cautela, ya que los resultados obtenidos pueden diferir de lo que ocurriría en microcosmos o mesocosmos al aire libre y escala ecosistémica. Incorporar estudios en condiciones naturales, con mayor complejidad ambiental y escala ecosistémica, permitiría que los resultados se acercaran aún más a los de sistemas reales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akbari, F., Andrade, N., Horwat, M., & Kjellerup, B.V., 2016. Biofilm biodegradation potential. En: Romaní, A.M., Guasch, H., & Balaguer, M.D. (Eds.) *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*. Caister Academic Press, 167-181 pp.

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.

Annett, R., Habibi, H.R., & Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. App. Toxicol.* 34, 458-479.

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(1), 29–35.

Bach, N., Natale, G., Somoza, G., & Ronco, A., 2016. Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*. 23, 23959-23971.

Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M., & Dietze, J.E., 2014. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 50, 275-290.

Beecraft, L., & Rooney, R., 2021. Bioconcentration of glyphosate in wetland biofilms. *Science of The Total Environment*, 756, 143993.

Benbrook C.M. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe* 28:1-15.

Bernini M.A. 2022. Efectos de exposición y recuperación del perifiton al herbicida glifosato y dos formulados comerciales. Tesis de licenciatura, FCEyN, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

Besemer, K., 2016. Microbial biodiversity in natural biofilms. En: Romaní, A.M., Guasch, H., & Balaguer, M.D. (Eds.) *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*. Caister Academic Press, 63-87 pp.

Bicudo, D. C. (1990). Considerações sobre metodologias de contagem de algas do perifíton. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 3(1), 459-475.

Blanck, H., 2002. A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 8(5), 1003–1034.

Borggaard, O.K. and A.L. Gimsing, 2008. Fate of Glyphosate in Soil and the Possibility of Leaching to Ground and Surface Waters: A Review. *Pest Management Science* 64:441-456.

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.

Boyd, J., & Banzhaf, S. (2007). What are ecosystem services? The need for standardized environmental accounting units. *Ecological Economics*, 63(2-3), 616-626.

Brock, T.C.M., & Budde, B.J., 1994. On the Choice of Structural Parameters and Endpoints to Indicate Responses of Freshwater Ecosystems to Pesticide Stress. En: Hill, I.R., Heimbach, F., Leeuwangh, P., & Matthiessen, P. (Eds.) *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals* (1st ed.). CRC Press. 19-56 pp.

Brovini, E.M., Cardoso, S.J., Quadra, G.R., Vilas-Boas, J.A., Paranaíba, J.R., Pereira, R.D.O., & Mendonça, R.F., 2021. Glyphosate concentrations in global freshwaters: are aquatic organisms at risk? *Environmental Science and Pollution Research*, 28(43), 60635–60648.

Bull, D. 1982. *A Growing Problem. Pesticides and the Third World Poor*. Oxford: Oxfam.

Bundschuh, M., Schulz, R., Schäfer, R.B., Allen, C.R., & Angeler, D.G., 2017. Resilience in ecotoxicology: Toward a multiple equilibrium concept. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(10), 2574–2580.

Castro Berman, M., Marino, D.J.G., Quiroga, M.V., & Zagarese, H., 2018. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere* 200, 513–522.

Castro Berman, M., Llames, M.E., Minotti, P., Fermani, P., Quiroga, M.V., Ferraro, M.A., Metz, S., Zagarese, H.E., 2020. Field evidence supports former experimental claims on the stimulatory effect of glyphosate on picocyanobacteria communities. *Science of The Total Environment*, 701, 134601.

Cavalcante, D., Martinez, C., & Sofia, S., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 655(1–2), 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(12), 1152–1160.

Chang, F., Simcik, M.F., & Capel, P.D., 2011. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3), 548–555.

Claude, B., Berho, C., Bayoudh, S., Amalric, L., Coisy, E., Nehmé, R., & Morin, P. (2017). Preliminary recovery study of a commercial molecularly imprinted polymer for the extraction of glyphosate and AMPA in different environmental waters using MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 12293-12300.

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.

Connell, J. H., & Slatyer, R. O. (1977). Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *The American Naturalist*, 111(982), 1119–1144.

Coupe, R. H., Kalkhoff, S. J., Capel, P. D., & Gregoire, C. (2012). Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Management Science*, 68(1), 16-30.

Dorigo, U., Bérard, A., Bouchez, A., Rimet, F., & Montuelle, B., 2010. Transplantation of Microbenthic Algal Assemblages to Assess Structural and Functional Recovery After Diuron Exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(4), 555–563.

Espinoza-Montero, P. J., Vega-Verduga, C., Alulema-Pullupaxi, P., Fernández, L., & Paz, J. L. (2020). Technologies employed in the treatment of water contaminated with glyphosate: a review. *Molecules*, 25(23), 5550.



El-Sebae, A.H. 1989. Fate and undesirable effects of pesticides in Egypt. In: Ecotoxicology and Climate, Edited by P. Bourdeau, J.A. Haines, W. Klein and C.R.K. Mufti. pp. 359-365. London: John Wiley & Sons.

FAO (2021). Agricultural expansion drives almost 90 percent of global deforestation. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAOSTAT. (2023) Pesticides Use in 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Feckler, A., Rakovic, J., Kahlert, M., Tröger, R., & Bundschuh, M. (2018). Blinded by the light: Increased chlorophyll fluorescence of herbicide-exposed periphyton masks unfavorable structural responses during exposure and recovery. *Aquatic Toxicology*, 203, 187–193.

Fisher, B., Turner, R. K., & Morling, P. (2009). Defining and classifying ecosystem services for decision making. *Ecological Economics*, 68(3), 643-653.

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 (3), 443–456.

Forlani, G., Bertazzini, M., Barillaro, D., Rippka, R., 2015. Divergent properties and phylogeny of cyanobacterial 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthases: evidence for horizontal gene transfer in the Nostocales. *New Phytol.* 205 (1), 160–171.

Franz, J.E., Mao, M.K., & Sikorski, J.A., 1997. Glyphosate: A Unique Global Herbicide. ACS Monographs 189. American Chemical Society, Washington, DC.

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.

Gluszczak, L., Miron, D.D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., & Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4), 519–524.

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.

Gonzalez, D., Juárez, Ángela, Krug, C. P., Santos, M., & Vera, M. S. (2019). Respuesta del perifiton de agua dulce al glifosato grado-técnico y dos formulados comerciales. *Ecología Austral*, 29(1), 020–027.

Guasch, H., Artigas, J., Bonet, B., Bonnineau, C., Canals, O., Corcoll, N., et al. (2016). “The use of biofilms to assess the effects of chemicals on freshwater ecosystems,” in *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*, eds A. M. Romaní, H. Guasch, and M. D. Balaguer (Girona: Caister Academic Press), 125–144.

Gustavson, K., Møhlenberg, F., & Schlüter, L., 2003. Effects of Exposure Duration of Herbicides on Natural Stream Periphyton Communities and Recovery. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45(1), 48–58.

Gustavsson M., Kreuger J., Bundschuh M., Backhaus T. 2017. Pesticide mixtures in the Swedish streams: Environmental risks, contributions of individual compounds and consequences of single-substance oriented risk mitigation. *Science of The Total Environment* 598:973-983.

Hébert, M., Fugère, V., & Gonzalez, A., 2019. The overlooked impact of rising glyphosate use on phosphorus loading in agricultural watersheds. *Front. Ecol. Environ.* 17(1), 48–56.

Iummato, M. M., et al. 2017. Hormetic effects of glyphosate on periphytic biomass: Responses in weight and ash-free dry mass. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 268–276.

Iummato, M.M., Fassiano, A., Graziano, M., dos Santos Afonso, M., Ríos de Molina, M.C., & Juárez, A.B., 2019. Effect of glyphosate on the growth, morphology, ultrastructure and metabolism of *Scenedesmus vacuolatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172, 471-479.

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.

Kattwinkel, M., Liess, M., Arena, M., Bopp, S., Streissl, F., & Römbke, J., 2015. Recovery of aquatic and terrestrial populations in the context of European pesticide risk assessment. *Environ. Rev.* 23(4), 382–394.

Khadra, M., Planas, D., Girard, C., Amyot, M., 2018. Age matters: submersion period shapes community composition of lake biofilms under glyphosate stress. *Facets* 3 (1), 934–951.

Klátyik, S., Takács, E., Mörtl, M., Földi, A., Trábert, Z., Ács, É., Darvas, B., & Székács, A., 2017. Dissipation of the herbicide active ingredient glyphosate in natural water samples in the presence of biofilms. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 97, 901–921

Klátyik, S., Takács, E., Barócsi, A., Lenk, S., Kocsányi, L., Darvas, B., & Székács, A. (2024). Hormesis, the Individual and Combined Phytotoxicity of the Components of Glyphosate-Based Formulations on Algal Growth and Photosynthetic Activity. *Toxics*, 12(4), 257.

La Point, T.W., 1994. Interpreting the Results of Agricultural Microcosm Tests: Linking Laboratory and Experimental Field Results to Predictions of Effect in Natural Ecosystems. En: Hill, I.R., Heimbach, F., Leeuwangh, P., & Matthiessen, P. (Eds.) *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals* (1st ed.). CRC Press. 83-94 pp.

Lapitz, R., Evia, G., & Gudynas, E., 2004. *Soja y Carne en el Mercosur*. Coscoroba, Montevideo, Uruguay.

Lawrence, J. R., Chenier, M. R., Roy, R., Beaumier, D., Fortin, N., Swerhone, G. D. W., & Dynes, J. J. (2001). Microscale and molecular approaches to biofilm study: herbicide sorption and metabolism in river biofilms. *Environmental Microbiology*, 3(3), 233-244.

Leff, L., Van Gray, J.B., Martí, E., Merbt, S.N., & Romaní, A.M., 2016. Aquatic biofilms and biogeochemical processes. En: Romaní, A.M., Guasch, H., & Balaguer, M.D. (Eds.) *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*. Caister Academic Press, 89-108 pp.

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.

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. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 1681–1688.

Loeb, S.L., Reuter, J.E., & Goldman, C.R., 1983. Littoral zone production of oligotrophic lakes. En: Wetzel, R.G. (Ed.) *Periphyton of freshwater ecosystems*. Dr. W. Junk Publishers, The Hage, Netherlands, 161–167 pp.

Lorenzen, C.J., 1967. Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology and Oceanography*, 12(2), 343–346.

Lowe, R.L., & Pan, Y., 1996. Benthic algal communities as biological monitors. En: Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.J. (Eds.) *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA, 705–739 pp.

Lozano, V., Vinocur, A., Sabio Y García, C., Allende, L., Cristos, D., Rojas, D., Wolansky, M., & Pizarro, H., 2018. Effects of glyphosate and 2,4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: a microcosms approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 1010–1019.

Lupi, L., Miglioranza, K.S., Aparicio, V.C., Marino, D., Bedmar, F., & Wunderlin, D.A., 2015. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment*, 536, 687-694.

Lutri V.F., Matteoda E., Blarasin M., Aparicio V., Giacobone D., Maldonado L., Becher Quinodoz F., Cabrera A., Giuliano Albo J. 2020. Hydrogeological features affecting spatial distribution of glyphosate and AMPA in groundwater and surface water in an agroecosystem. Córdoba, Argentina. *Science of The Total Environment* 711:134557.

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.

Macchi, P., Loewy, R.M., Lares, B. et al. 2018. The impact of pesticides on the macroinvertebrate community in the water channels of the Río Negro and Neuquén Valley, North Patagonia (Argentina). *Environ Sci Pollut Res* 25, 10668–10678.

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.

Marker, A.F.H., Crowther, C.A., & Gunn, R.J.M., 1980. Methanol and acetone as solvents for estimating chlorophyll a and phaeopigments by spectrophotometry. *Archiv. Hydrobiol. Beiheft. Ergebn. Limnol.*, 14, 52–69.

Massard-Guilbaud, G., & Mathis, C-F., 2017. A brief introduction to the history of pollution: from local to global. En: Cravo-Laurel, C., Cagnon, C., Lauga, B., Duran, R. (Eds.) *Microbial Ecotoxicology*, Springer, 3-15 pp.

Matthews, R.A., Kondratieff, P.F. & Buikema, A.L. A field verification of the use of the autotrophic index in monitoring stress effects. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 226–233 (1980).

Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis*. Island Press, Washington, DC.

Mora-Gómez, J., Freixa, A., Perujo, N., & Barral-Fraga, L., 2016. Limits of the biofilm concept and types of aquatic biofilms. En: Romaní, A.M., Guasch, H., & Balaguer, M.D. (Eds.) *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*. Caister Academic Press, 3-27 pp.

Morin, S., Lambert, A.S., Artigas, J., Coquery, M., & Pesce, S., 2012. Diatom immigration drives biofilm recovery after chronic copper exposure. *Freshwater Biology*, 57(8), 1658–1666.

Morin, S., Pesce, S., et al. (2012). "Diuron-induced alterations of river biofilm structure and function." *Environmental Science and Pollution Research*, 19(1), 148-161.

Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B. et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health* 15, 19 (2016).

Nguyen, J., Lara-Gutiérrez, J., & Stocker, R. (2021). Environmental fluctuations and their effects on microbial communities, populations and individuals. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(4), fuaa068.

Okada, E., Costa, J.L., & Bedmar, F., 2016. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* 263, 78-85.

Oliveira, A.G., Telles, L.F., Hess, R.A., Mahecha, G.A.B., & Oliveira, C.A., 2007. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. *Reprod. Toxicol.* 23(2), 182–191.

Oliver, T. H., Heard, M. S., et al. (2015). "Biodiversity and resilience of ecosystem functions." *Trends in Ecology & Evolution*, 30(11), 673-684.

Paruelo, J. M., et al. (2010). "Expansión agrícola en Argentina y su impacto en los ecosistemas." *Journal of Environmental Management*.

Pereira, H. A., Hernandez, P. R. T., Netto, M. S., Reske, G. D., Viecei, V., Oliveira, L. F. S., & Dotto, G. L. (2021). Adsorbents for glyphosate removal in contaminated waters: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 1525-1543.

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 Society of America. Ecological Applications* 17, 2310-2322.

Pérez, G.L., Vera, M.S., & Miranda, L.A., 2011. Effects of Herbicide Glyphosate and GlyphosateBased Formulations on Aquatic Ecosystems. En: *Herbicides and Environment*, Andreas Kortekamp (Ed) 16, 343-368.

Pérez D.J., Okada E., De Gerónimo E., Menone M.L., Aparicio V.C., Costa J.L. 2017. Spatial and temporal trends and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36:3206-3216.

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 the north pampasic region of Argentina. *Environ Pollut* 156, 61–66.

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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1905–1912.

Pesce, S., Bouchez, A., & Montuelle, B., 2012. Effects of Organic Herbicides on Phototrophic Microbial Communities in Freshwater Ecosystems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 214, 87–124.

Pesce, S., Baudoin, J.-M., et al. (2017). "Ecological risk assessment of herbicides for freshwater ecosystems: a review." *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3), 2485-2501.

Peterson, C. G., & Stevenson, R. J. (1992). Resistance and resilience of lotic algal communities: Importance of disturbance timing and current. *Ecology*, 73(4), 1445–1461.

Pimentel, D. 1989. Impacts of pesticides and fertilizers on the environment and public health. In: *Toxic Substances in Agricultural Water Supply and Drainage*, edited by J.B. Summers and S.S. Anderson, pp. 95-108. Denver, CO: U.S. Committee on Irrigation and Drainage.

Pimentel, D., 1996. Green revolution agriculture and chemical hazards. *Science of The Total Environment*, 188, S86–S98.

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.

Proia, L., Morin, S., Peipoch, M., Romaní, A., & Sabater, S., 2011. Resistance and recovery of river biofilms receiving short pulses of Triclosan and Diuron. *Science of The Total Environment*, 409(17), 3129–3137.

Prosser, R. S., Brain, R. A., Malia Andrus, J., Hosmer, A. J., Solomon, K. R., & Hanson, M. L., 2015. Assessing temporal and spatial variation in sensitivity of communities of periphyton sampled from agroecosystem to, and ability to recover from, atrazine exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 204–216.

Prosser, R.S., Brain, R.A., Hosmer, A.J., Solomon, K.R., & Hanson, M.L., 2013. Assessing sensitivity and recovery of field-collected periphyton acutely exposed to atrazine using PSII inhibition under laboratory conditions. *Ecotoxicology*, 22(9), 1367–1383.

R Core Team, 2024. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>

Relyea, R.A., & Jones, D.K., 2009. The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 2004-2008.

Richmond, M. E. (2018). Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *Journal of Environmental Studies and Sciences*.

Robinson, G.G.C., 1983. Methodology: the key to understanding periphyton. En: Wetzel, R.G. (Ed.) *Periphyton of freshwater ecosystems*. Dr. W. Junk Publishers, The Hage, Netherlands, 245–251 pp.

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.

Rohr, J.R., Kerby, J.L., & Sih, A., 2006. Community ecology as a framework for predicting contaminant effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(11), 606–613.

Ronco, A.E., Marino, D.J.G., Abelando, M., Almada, P., & Apartin, C.D., 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environmental monitoring and assessment*, 188(8), 458.

Rooney, R., Davy, C., Gilbert, J., Prosser, R., Robichaud, C., & Sheedy, C., 2020. Periphyton bioconcentrates pesticides downstream of catchment dominated by agricultural land use. *Science of The Total Environment*, 702, 134472.

Roos, P.J., 1983. Dynamics of periphytic communities. En: Wetzel, R.G. (Ed.) *Periphyton of freshwater ecosystems*. Dr. W. Junk Publishers, The Hage, Netherlands, 5–10 pp.

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.

Sabio Y García, C.A., Schiaffino, M.R., Lozano, V.L., Vera, M.S., Ferraro, M., Izaguirre, I., & Pizarro, H., 2020. New findings on the effect of glyphosate on autotrophic and heterotrophic picoplankton structure: A microcosm approach. *Aquatic Toxicology*, 222, 105463.

Sáenz, M.E., y Di Marzio, W.D., 2009. Ecotoxicidad del herbicida Glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. *Asociación Ibérica de Limnología*, Madrid, España. *Limnetica*, 28, 149-158.

Salisbury F.B., Ross C.W. 1994. *Fisiología vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica, México D.F., 759 pp.



Sasal, M.C., Wilson, M.G., Sione, S.M., Beghetto, S.M., Gabioud, E.A., Oszust, J.D., Paravani, E.V., Demonte, L., Repetti, M.R., Bedendo, D.J., Medero, S.L., Goette, J.J., Pautasso, N., & Schulz, G.A., 2017. Monitoreo de glifosato en agua superficial en Entre Ríos. La investigación acción participativa como metodología de abordaje. *RIA Rev. Investig. Agropecu.* 43, 195–205.

Schäfer, R.B., van den Brink, P.J., & Liess, M., 2011. Impacts of pesticides on freshwater ecosystems. En: Sánchez-Bayo, F., van den Brink, P.J., & Mann, R.M. (Eds.) *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, Sharjah: Bentham Science Publishers, 111–137 pp.

Schütte, G., Eckerstorfer, M., Rastelli, V. et al. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environ Sci Eur* 29, 5 (2017).

Sesin, V., Davy, C.M., Stevens, K.J., Hamp, R., & Freeland, J.R., 2020. Glyphosate Toxicity to Native Nontarget Macrophytes Following Three Different Routes of Incidental Exposure. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 17(3), 597–613.

Soracco, C.G., Villarreal, R., Lozano, L.A., Vittori, S., Melani, E.M., & Marino, D.J., 2018. Glyphosate dynamics in a soil under conventional and no-till systems during a soybean growing season. *Geoderma*, 323, 13–21.

Steinman, A.D., & McIntire, C.D., 1990. Recovery of lotic periphyton communities after disturbance. *Environ. Manag.* 14(5), 589–604.

Székács, A., & Darvas, B., 2012. Forty Years with Glyphosate. En: Hasaneen, M.N. (Ed.). *Herbicides – Properties, Synthesis and Control of Weeds*, InTech, Rijeka, Croatia. 247-284 pp.

Thomson W. T. 1993. *Agricultural Chemicals. Book II Herbicides*. Thomson Publications, Fresno, USA, 310 pp.

Tilman, D., 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 5995-6000.

Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., & Swackhamer, D., 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292(5515), 281-284.

Trigo EJ y Cap EJ (2006). Diez años de cultivos transgénicos en la agricultura Argentina. ArgenBio, Buenos Aires, 53 pp.

Tsui, M.T., & Chu, L., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), 1189–1197.

Tsui, M.T.K., & Chu, L.M., 2008. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup®) in a subtropical wetland. *Chemosphere*, 71(3), 439-446.

Twardowska, I. (2004). Ecotoxicology, environmental safety, and sustainable development—challenges of the third millennium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(1), 3–6.

Van Bruggen, A., He, M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K., Finckh, M., & Morris, J., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*, 616–617, 255–268.

Van Stempvoort, D.R., Roy, J.W., Brown, S.J., & Bickerton, G. (2014). Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments. *Chemosphere*, 95, 455-463.

Vera, M.S., & Trinelli, M.A., 2021. First evaluation of the periphyton recovery after glyphosate exposure. *Environmental Pollution*, 290, 117998.

Vera, M.S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M.M., Juárez, A., Ríos de Molina, M.delC., Tell, G., & Pizarro, H., 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* 21, 1805-1816.

Vera, M.S., Juárez, Á.B., & Pizarro, H.N., 2014. Comparative effects of technical grade and a commercial formulation of glyphosate on the pigment content of periphytic algae. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 93(4), 399-404.

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

Villamar-Ayala, C.A., Carrera-Cevallos, J.V., Vasquez-Medrano, R., & Espinoza Montero, P.J., 2019. Fate, eco-toxicological characteristics, and treatment processes applied to water polluted with glyphosate: a critical review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 49, 1476-1514

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.

WHO/UNEP. 1989. *Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture*. Geneva: World Health Organization/ United Nations Environment Programme.

Wood, R.J., Mitrovic, S.M., Lim, R.P., & Kefford, B.J., 2017. Chronic effects of atrazine exposure and recovery in freshwater benthic diatoms from two communities with different pollution histories. *Aquatic Toxicology*, 189, 200–208.

Yaah, V. B. K., Ahmadi, S., Quimbayo, J., Morales-Torres, S., & Ojala, S. (2024). Recent technologies for glyphosate removal from aqueous environment: A critical review. *Environmental Research*, 240, 117477.

Zabaloy, M.C., Allegrini, M., Hernandez Guijarro, K. et al. 2022. Microbiomes and glyphosate biodegradation in edaphic and aquatic environments: recent issues and trends. *World J Microbiol Biotechnol* 38, 98.

## ANEXO I

*Resumen de los p-valores de los modelos lineales generales para las variables del agua de los microcosmos. Cada periodo (exposición y recuperación) y las comunidades (P1 y P2) fueron analizados por separado. En negrita se indican los valores estadísticamente significativos ( $p\text{-valor} < 0,05$ ).*

	Variable	Periodo	Interacción herbicida-tiempo	Herbicida	Tiempo
<b>P1</b>	Turbidez (NTU)	Exposición	<b>0,0038081</b>	<b>0,0051518</b>	<b>0,0004889</b>
		Recuperación	<b>0,0054974</b>	<b>0,0001486</b>	<b>2,136x10<sup>-6</sup></b>
	Oxígeno disuelto (mg/L)	Exposición	0,6802	0,8787	<b>8,675x10<sup>-6</sup></b>
		Recuperación	0,06024	0,58386	<b>9,919x10<sup>-11</sup></b>
	pH	Exposición	0,98533	<b>0,04009</b>	0,92676
		Recuperación	0,1482479	<b>0,0004166</b>	<b>0,0251143</b>
	Conductividad (mS/cm)	Exposición	0,34769	<b>0,04077</b>	<b>3,277x10<sup>-5</sup></b>
		Recuperación	0,8578	0,5338	<b>1,806x10<sup>-8</sup></b>
	Clorofila <i>a</i> fitoplanctónica (µg/L)	Exposición	0,14525	0,14752	<b>0,03449</b>
		Recuperación	<b>0,012584</b>	<b>0,001522</b>	<b>7,766x10<sup>-6</sup></b>
	Fósforo total (mg/L)	Exposición	0,5543642	<b>0,0003117</b>	0,6916118
		Recuperación	0,99989	0,74061	<b>0,01229</b>
<b>P2</b>	Turbidez (NTU)	Exposición	<b>0,0015237</b>	<b>0,0008177</b>	<b>2,822x10<sup>-7</sup></b>
		Recuperación	<b>0,02156</b>	<b>7,209x10<sup>-6</sup></b>	<b>5,139x10<sup>-6</sup></b>
	Oxígeno disuelto (mg/L)	Exposición	0,7109	0,4644	<b>8,871x10<sup>-8</sup></b>
		Recuperación	<b>0,00584</b>	0,15934	<b>1,571x10<sup>-9</sup></b>
	pH	Exposición	0,5187	0,5187	0,1861
		Recuperación	0,784750	0,726288	<b>0,002156</b>
	Conductividad (mS/cm)	Exposición	0,8209	0,3769	<b>1,068x10<sup>-6</sup></b>
		Recuperación	0,3371	0,1520	<b>6,425x10<sup>-11</sup></b>
	Clorofila <i>a</i>	Exposición	0,1148348	0,0645839	<b>0,0008459</b>

	fitoplanctónica (µg/L)	Recuperación	<b>0,0001303</b>	<b>2,475x10<sup>-8</sup></b>	<b>1,266x10<sup>-9</sup></b>
	Fósforo total (mg/L)	Exposición	<b>0,072726</b>	<b>3,589x10<sup>-11</sup></b>	<b>0,003293</b>
		Recuperación	0,94713	0,37780	<b>0,02554</b>