

Tesis Doctoral

Impacto conjunto de dos agentes antropogénicos de cambio ambiental: efecto del herbicida glifosato y del mejillón invasor *Limnoperna fortunei* en ecosistemas de agua dulce

Di Fiori, Eugenia

2014-05-16

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

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

Cita tipo APA:

Di Fiori, Eugenia. (2014-05-16). Impacto conjunto de dos agentes antropogénicos de cambio ambiental: efecto del herbicida glifosato y del mejillón invasor *Limnoperna fortunei* en ecosistemas de agua dulce. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Di Fiori, Eugenia. "Impacto conjunto de dos agentes antropogénicos de cambio ambiental: efecto del herbicida glifosato y del mejillón invasor *Limnoperna fortunei* en ecosistemas de agua dulce". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-05-16.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Impacto conjunto de dos agentes antropogénicos
de cambio ambiental: efecto del herbicida
glifosato y del mejillón invasor *Limnoperna
fortunei* en ecosistemas de agua dulce**

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

Lic. Eugenia Di Fiori

Directores de tesis: Dra. Haydée Pizarro
Dr. Daniel Cataldo

Consejero de Estudios: Dra. Irina Izaguirre

Buenos Aires, 2014

Indice

• Resumen	i
• Abstract	ii
• Agradecimientos	iii
• Introducción	1
• Objetivo General	19
• Sección I: Estudio de la interacción del glifosato y del mejillón <i>Limnoperna fortunei</i> en ensayos de laboratorio	
Introducción	21
Objetivo e Hipótesis	26
Metodología	28
Resultados	35
Discusión	43
• Sección II: Interacción del glifosato y del mejillón <i>Limnoperna fortunei</i> sobre comunidades microbianas y la calidad del agua dulce: un estudio en microcosmos al aire libre	
Introducción	52
Objetivo e Hipótesis	60
Metodología	62
Resultados	74
Discusión	146
• Conclusiones Generales	174
• Referencias Bibliográficas	178

Impacto conjunto de dos agentes antropogénicos de cambio ambiental: efecto del herbicida glifosato y del mejillón invasor *Limnoperna fortunei* en ecosistemas de agua dulce

El hombre ha generado durante las últimas décadas un importante cambio en los ecosistemas que lo sostienen. En la naturaleza los agentes de impacto ambiental no actúan de forma aislada sino por el contrario operan de manera conjunta, pudiendo provocar importantes cambios sobre las comunidades afectadas. En este sentido, el objetivo de la tesis fue analizar el efecto de la interacción de dos factores de cambio introducidos por la actividad humana sobre los ecosistemas de agua dulce: el herbicida glifosato y el molusco invasor *Limnoperna fortunei*. Se estudió el impacto conjunto sobre la estructura de las principales comunidades microbianas y sobre la calidad del agua mediante aproximaciones en ensayos controlados de laboratorio y a escala ecosistémica en microcosmos al aire libre. Se encontró que bajo las mismas condiciones, la presencia de *L. fortunei* acelera la disipación del glifosato en agua en casi 4 veces, con una velocidad de hasta $50,2 \pm 3,4$ gs por gramo de peso seco del tejido blando de mejillones por día, excretando fosfatos como producto de su degradación. Asimismo, pudimos detectar que tanto el mejillón íntegro como sus valvas por separado participan en la reducción del glifosato disuelto, determinando de forma más precisa el modo de acción de este factor sobre el herbicida. Si bien la presencia del molusco favorece la disipación del glifosato, la acción conjunta del agroquímico y *L. fortunei* sería perjudicial para los ecosistemas de agua dulce ya que presentan un efecto sinérgico, producto de su interacción. El aporte de nutrientes a partir de la degradación del herbicida promueve el desarrollo del bacterioplancton, estimula el crecimiento de algas filamentosas y aumenta la turbidez acelerando el deterioro de la calidad del agua en el corto plazo. Los estudios a escala ecosistémica sobre el impacto de agentes de estrés ambiental y su interacción sobre comunidades en microcosmos a la intemperie permiten predecir con mayor grado de realismo los efectos de la actividad del hombre sobre el ambiente natural.

Palabras clave: Glifosato, *Limnoperna fortunei*, comunidades microbianas, interacción de factores antropogénicos, agua dulce, microcosmos.

Abstract

Joint impact of two anthropogenic agents of environmental change: effect of glyphosate herbicide and the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on freshwater ecosystems

During the past decades human activity has created a major shift in surrounding ecosystems. In nature, the environmental impact agents do not act separately but rather interact and operate together, being able to generate major changes on affected communities. Accordingly, the aim of this Thesis was to analyze the effect of the interaction of two environmental impact agents introduced by human activity on freshwater ecosystem: the glyphosate herbicide and the invasive mussel *Limnoperna fortunei*. We studied the joint impact on the structure of the main microbial communities and on water quality through experimental approaches in laboratory and in outdoor microcosms. We found that under the same conditions, the presence of *L. fortunei* accelerates glyphosate dissipation in water at about 4 times, with a speed of up to $50,2 \pm 3,4$ gs per gram of mussel dry weight per day, excreting phosphates as a breakdown product. Moreover, we detected that both the entire mussel as well as its empty valves participate in glyphosate dissipation in water column, determining more accurately its mode of action on the herbicide. Although mussels's presence favours glyphosate dissipation, the combined effect of the agrochemical and *L. fortunei* would be detrimental to freshwater ecosystems as they present a synergic effect, due to their interaction. Nutrient overload due to herbicide degradation accelerated bacterioplankton development, stimulates the growth of filamentous algae and enhances water turbidity through time, promoting the impoverishment of the water quality in the short term. Ecosystem-scale studies on the impact of environmental stressors and their interaction on outdoor microcosms communities become more realistic approaches when predicting the effect of human activity on natural environment.

Key Words: Glyphosate, *Limnoperna fortunei*, Microbial communities, Interaction of anthropogenic agents, Freshwater Ecosystem, Microcosms.

Agradecimientos

Si bien el camino del doctorado es muchas veces bastante solitario, la tesis es siempre posible gracias al apoyo y la colaboración de muchísima gente, desde lo profesional, hasta lo personal. Trataré de ser justa al resumir lo agradecida que estoy a tanta gente que me acompañó en estos últimos 5 años de mi vida.

Quisiera agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y sus docentes, por la educación de alta calidad que no solo me brindó herramientas y recursos, sino que además me acercó a grandes científicos que desarrollan su trabajo con seriedad y dedicación, reconocidos por pares en todo el mundo. Es un gran orgullo saber que nuestra universidad pública genera científicos altamente capacitados.

Quisiera agradecer a mis directores, la Dra. Haydée Pizarro y el Dr. Daniel Cataldo, por acompañarme en el camino de la investigación, por compartir sus conocimientos y estimularme a desarrollar los propios. Muchas gracias Haydée por tu enorme confianza en mí, por abrirme la posibilidad de investigar, por darme libertad y también valorar mi mundo. Una de las grandísimas virtudes de Haydée es saber reaccionar (bien) ante los errores del becario cuando las cosas salen mal. Gracias Dani y Haydée por trabajar muchas veces a la par mía: Dani en la instalación de los tanques, en la recolección de los mejillones, en los ensayos de laboratorio, en cortar los mil-y-un sustratos para los perifitómetros; Haydée en los muestreos, en el procesamiento del material y en mirar las muestras de perifiton al microscopio. Muchas gracias! Estaré además, eternamente agradecida a Haydée por ofrecerme asistir al congreso de la ASLO en Puerto Rico; sin duda una de las experiencias más ricas del doctorado.

Quisiera agradecer a todo el equipo de Limnología de la UBA. Al Dr. Guillermo Tell, director del laboratorio al momento de comenzar mi doctorado, gracias por abrirme las puertas a su grupo, por recibirme afectuosamente, y por transmitirme parte de su largo legado taxonómico, sentándose conmigo a mirar las algas bajo el microscopio. De la misma manera, un millón de gracias a las Dras. Irina Izaguirre e Inés O'Farrell, quienes me han respondido infinidad de preguntas taxonómicas en los recuentos de fitoplancton; siempre dispuestas y con una sonrisa. Junto con Ali, Iri e Ine me han hecho sentir siempre parte del equipo. Rubén Lombardo, quien además de compartir interesantes charlas sobre la vida, me ayudó muchísimo con toda (toooda) la estadística de la tesis, siempre con su paciente sonrisa. Y gracias Rubén por ayudarme en el armado de los dispositivos de los tanques un largo día de febrero en el Campo Experimental! Luz Allende, qué lindo que la vida nos haya llevado a trabajar juntas. Gracias por contagiarme tu alegría, entusiasmo y vocación. Sole, que junto con Luz, hicieron del laboratorio 95 un hogar (sin ventana pero con gran corazón!). Gracias Sole por tu amistad, por ser tan atenta, cariñosa y generosa. Patri, querida amiga, gracias por tanta locura y sensibilidad. Y millón de gracias por trabajar a la par mía en cada uno de los muestreos de los tanques (días

Agradecimientos

largos de mucho, mucho trabajo). Sin vos, todavía estaría procesando los nutrientes! Rodri y Pablo, gracias por ponerle siempre humor a los almuerzos y reuniones, me llevo muchas risas y anécdotas divertidas! Paulita, gracias por tu entusiasmo contagioso, y por compartir tu estimulante visión de mundo y de amor por la ciencia. A Romi, por ser, además de una amiga, una gran compañera, tanto de laboratorio como de viaje. Que lindo compartir el congreso y el viaje con vos! Sol, por toda tu ayuda, por estar siempre atenta e interesada en el otro y por tu amistad. Laurita, gran amiga, gracias por tantos momentos, tantas charlas, tantos mates, tus consejos y tu aguante, y por toda la ayuda que me diste en el laboratorio cuando la necesité. Gracias queridísima Griso por aguantarme y acompañarme en tantos momentos. Tu amistad me hizo crecer mucho. Juancito, no sólo me bancaste infinidad de monólogos, sino que me alimentaste el último año de trabajo, a mí y a mi lombriz solitaria. Gracias por tu buena onda, tu genuino interés y tu optimismo de siempre! A todos ellos, además, gracias por participar en las campañas en los microcosmos en el Campo Experimental. Tuve la suerte de trabajar con gente maravillosa, y me llevo, además de recuerdos y aprendizajes, muchos amigos de estos años.

Quisiera agradecer a Francisco Molinos, quien participó voluntariamente cavando pozos para la instalación de los tanques, y Marina Ramírez (tesista de licenciatura en el laboratorio), en colaborar con el procesamiento de las muestras del experimento al aire libre.

La Dra. María dos Santos Afonso me ha abierto las puertas de su laboratorio en el INQUIMAE, y me enseñó a realizar la cromatografía de intercambio iónico para el análisis de la concentración de glifosato en agua. Además, me prestó innumerables veces su columna aniónica para los análisis. Gracias Mari por tu predisposición, por responder innumerables veces a la puerta cada vez que iba a verte, y por sentarte conmigo a mirar mis resultados y darme un punto de vista químico y analítico sumamente útiles. A los integrantes del laboratorio de Aguas del INQUIMAE: Alci, Jose Luis, Romi, María del Mar y Rena. Desde su amistad hasta su colaboración, muchísimas gracias. Estoy especialmente agradecida a Jose Luis Marco Brown y Alcira Trinelli quienes me han ayudado con paciencia y generosidad una infinidad de veces tanto en el laboratorio de aguas como en los análisis de cromatografía iónica. A Vicente Povse por asistirme tantas veces, siempre con su buen humor, durante los días del uso del iónico.

El Sr. Héctor Verna por tanta ayuda que me ha brindado en cuanto al Campo Experimental y al desarrollo del experimento en los tanques que allí instalamos. Gracias por transmitir su sabiduría en todo lo que hace, por la vocación al trabajo y hacerme recordar que la felicidad está en lo simple. Ojalá algún día aprenda a escuchar a las plantas...

Agradecimientos

Gracias a las compañeras de la huerta: Ine, Luz, Romi, Sole, Gri y Luciana, por hermosos momentos. Gracias a mis alumnos de Chi: Tato, Sol, Romi, Gri, María Sol y Gaby por la confianza, la vocación y la búsqueda. Gracias Pau Lipko por darle sentido a mi espacio, por confiar, por tu cariño, consejos y amistad.

A los amigos de la facultad, que si bien nos vemos cada tanto, el cariño y la confianza están intactos. Nico Rascovan, Gi Perthuy, Belu Carbonetto, Naty Martínez y Andirolas Giordano. A Lau Andrade por la amistad y las lindas charlas. Gracias Gri, Petri, Andy Palmerio y Gabi Corral por compartir ricos asados y muy buenos momentos.

A Benito, mi gato, porque escribió la tesis conmigo, sentado pacientemente en mi regazo, horas, días, meses, si es que no andaba por ahí cazando alguna pobre presa. Y a “Metro y Medio” por acompañarme gran parte de las tardes laborales y hacerme reír con sus ocurrencias.

A mis amigas de la vida: Ine, Sole, Vicky, Moi, Jacketa, Luli, Cota, Nat y el resto de las “pili&mili”: por lo real, lo sincero y lo genuino. A Pedri, querido amigo, por lo mismo.

A Sergio y Grace, mis profesores de piano y de Chi Kung, que me han dado mucho, mucho más que un profesorado, más bien, una filosofía de vida. Por transmitir con generosidad y pasión sus conocimientos, acompañándome con su afecto y amistad en mi camino de aprendizaje y crecimiento. A Juan Carlos Tsuji, por sumarse en este recorrido.

A Barbi, hermana de la vida, que caminaste conmigo cada paso...gracias!!!! ahora te toca a vos amiga!

A mis hermanos: Nicolás, Valeria, Luciano (y Ceci!), quienes además de ser siempre un puerto seguro donde volver, me acompañan y estimulan en mis elecciones. Gracias por el amor incondicional. Nicolás y Valeria, además, me han revisado el inglés del paper y con la edición de esta tesis. Y todos ellos, por alegrarme con los sobrinos hermosos que trajeron.

A mis padres, Jorge y María Luisa, porque no sólo me brindaron la formación básica con la que uno aprende a mirar y entender el mundo, sino que me contagiaron la curiosidad y la pasión por buscar ser feliz en lo que se hace. Me enseñaron que con trabajo y creatividad se mueven montañas. Y de una manera u otra, sin saberlo, los dos (abogados) me contagiaron su espíritu naturalista que definió mi vocación biológica.

A todos y cada uno, MUCHAS GRACIAS!!!!

Agradecimientos

Esta tesis fue realizada con el apoyo de becas otorgadas por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y por el CONICET; y con aporte de dos subsidios: PICT 2006-1104 y 2010-0908 y un subsidio UBACYT 20020100100550.

DESIDERATA

(Anónimo)

Anda plácidamente entre el ruido y la prisa, y recuerda qué paz puede haber en el silencio. Vive en buenos términos con todas las personas, todo lo que puedas sin rendirte. Di tu verdad tranquila y claramente. Escucha a los demás, incluso al aburrido y al ignorante, ellos también tienen su historia. Evita a las personas ruidosas y agresivas, sin vejaciones al espíritu. Si te comparas con otros puedes volverte vanidoso y amargo: porque siempre habrá personas más grandes y más pequeñas que tú. Disfruta de tus logros como de tus planes. Mantén el interés en tu propia carrera, aunque sea humilde, es tu verdadera posesión en las cambiantes fortunas del tiempo. Usa la precaución en tus negocios, porque el mundo está lleno de trampas. Pero no por eso te ciegues a la virtud que puede existir, mucha gente lucha por altos ideales, y en todas partes, el mundo está lleno de heroísmo. Sé tu mismo, especialmente no finjas afectos. Tampoco seas cínico respecto del Amor: porque frente a toda aridez y desencanto, el Amor es perenne como la hierba. Recoge mansamente el consejo de los años, renunciando mansamente a las cosas de la juventud. Nutre tu fuerza espiritual para que te proteja en la desgracia repentina. Pero no te angusties con fantasías. Muchos de los temores nacen de la fatiga y de la soledad. Junto con una sana disciplina, sé amable contigo mismo.

Tú eres una criatura del universo no menos que los árboles y las estrellas: tú tiene derecho a estar aquí. Y te resulte evidente o no, el universo se desenvuelve como debe. Por lo tanto mantente en paz con Dios, de cualquier modo que lo concibas, y cualquiera sean tus trabajos y aspiraciones, mantén en la ruidosa confusión, paz con tu alma. Con todas tus farsas y sueños rotos, éste sigue siendo un mundo hermoso. Ten cuidado, y esfuérate en ser feliz.

A mis maestros

Graciela Ortiz

Sergio Scordamaglia

Introducción

Introducción

i) Cambios en los ecosistemas causados por la actividad humana

El hombre ha generado durante las últimas décadas un importante cambio en los ecosistemas que lo sostienen. Recientemente se ha comenzado a hacer evidente que nuestra futura supervivencia depende estrechamente del uso sustentable de los recursos naturales y de la capacidad del ambiente en sostenernos (Twardowska 2004). A fines del siglo pasado, científicos de diversos países, en los que se encontró representada la Argentina, se reunieron para evaluar y discutir el estado de los ecosistemas del mundo y los bienes y servicios brindados por estos, analizando su deterioro debido a la actividad del hombre. Como producto de este encuentro se generaron numerosos informes de diagnóstico con el objeto de proveer a las organizaciones políticas y sociales de los países de herramientas racionales con base científica a la hora de tomar decisiones que involucren al ambiente (Millenium Ecosystem Assessment 2005). Según estos análisis, un factor directo de cambio ambiental será aquel que afecte unívocamente a la estructura y funcionamiento de un ecosistema, mientras que uno indirecto va a operar de manera más difusa, a través de la alteración de uno o más factores directos. Se describen entonces como importantes factores de cambio directo a la fragmentación de hábitat, el cambio climático, la sobreexplotación de los recursos, la contaminación y la introducción de especies invasoras. Los factores de cambio indirecto más citados son: la demografía humana, los efectos causados por nuevos aportes de la ciencia y la tecnología, las influencias culturales y las políticas nacionales e internacionales en economía y en sociopolítica.

Los avances en ciencia y tecnología aplicados a la obtención de alimento para una población mundial en crecimiento, se vieron potenciados durante el último siglo y han generado cambios en la forma de utilizar los servicios de los ecosistemas. Como resultado, en los últimos 40 años se ha duplicado la cantidad de alimento producido mundialmente, debido principalmente a un incremento del rendimiento por área cultivada. Durante este período el rendimiento del trigo aumentó 208%, la producción de arroz aumentó 109% y los rendimientos de maíz aumentaron 157% en los países en desarrollo (Millenium Ecosystem Assessment 2005). Estos incrementos se encuentran asociados al cambio sustancial en el tipo de agricultura, pasando del ámbito familiar al industrial o empresarial. La ingeniería genética ha incorporando en este tipo de

práctica agrícola a gran escala especies genéticamente modificadas con tolerancia a determinados agroquímicos, resultando en las últimas décadas en un incremento exponencial del uso de los herbicidas e insecticidas en el campo. Al mismo tiempo, los avances tecnológicos aplicados a la agricultura incorporaron herramientas para evitar la pérdida de agua y la erosión de los suelos mediante la práctica de la siembra directa, a la que se le suma el barbecho químico, con aplicación de herbicidas (Leguizamón 2009). Por otro lado, el reemplazo de ambientes naturales por tierras de cultivo ha llevado al deterioro de los ecosistemas ya que por lo general los sistemas de cultivo tienden a usar mayor volumen de agua, aumentan la contaminación de cuerpos de agua naturales, incrementan la erosión, almacenan menos carbón, emiten más gases de efecto invernadero y sostienen menos biodiversidad que los sistemas naturales que reemplazan, debido principalmente a la gran fragmentación del hábitat producto de la extensión de la frontera agropecuaria (Millenium Ecosystem Assessment 2005). Asimismo, los cuerpos de agua de zonas agrícolas han sufrido un deterioro debido al aporte de nutrientes y de sedimentos por parte de las tierras cultivadas, como también ha llevado a un aumento en la temperatura del agua debido a la deforestación de zonas riparias (Piggott *et al.* 2012).

ii) El agua dulce

De las reservas naturales de agua dulce que hay en el planeta, solamente el 0,3% ($113 \times 10^3 \text{ km}^3$) son accesibles al hombre, y constituyen cuerpos de agua superficiales y aguas subterráneas. El 99,7% del agua dulce restante se encuentra inaccesible al uso humano, en glaciares (76,4%) o en aguas profundas (22,8%) (Kalff 2002). Para los ecosistemas de agua dulce y sus servicios, los factores de cambio directo más importantes en los últimos 50 años incluyen la alteración de los regímenes hídricos debido a la extracción de agua para uso agrícola e industrial, como así también debido al represamiento de los cursos, la introducción de especies invasoras, la contaminación, y el aumento en la carga de nutrientes (Millenium Ecosystema Assessment 2005). El desarrollo agrícola ha sido históricamente una de las principales causas de deterioro de los sistemas de aguas continentales. Se calcula que para el año 1985, en Europa y los Estados Unidos, entre el 56-65% de aguas continentales han sido

drenadas para la agricultura intensiva, en Asia el 27% y en Sudamérica el 6% (Millenium Ecosystema Assessment 2005). Asimismo, la contaminación de cuerpos de agua producida principalmente por el ingreso de fertilizantes, ha reducido la capacidad de dichos ambientes de asimilar y procesar los desechos que reciben. Como resultado, se han visto deteriorados numerosos cuerpos de agua continentales debido al excesivo aporte de nutrientes proveniente de cultivos a gran escala, llevando a una eutrofización de los ambientes acuáticos naturales. Las floraciones de cianobacterias, frecuentes en procesos de eutrofización, en lagos, lagunas y aguas costeras, es un problema que actualmente preocupa en todo el mundo (Bell y Codd 1996, Carmichael 1994, Conroy *et al.* 2005, Kalff 2002).

En la Argentina el cultivo intensivo de soja, cultivo con una alta demanda de nutrientes, ha agotado los suelos generando una continua incorporación de fertilizantes a los mismos (Mugni *et al.* 2005). Se calcula que hasta el año 2006, los cultivos de soja han extraído 1 millón de toneladas de nitrógeno (N) de los suelos, y 227.000 toneladas de fósforo (P) (Altieri y Pengue 2006). Asimismo, además de agotar los recursos del suelo, el cultivo de soja requiere el suministro de grandes cantidades de agroquímicos, entre ellos fertilizantes y herbicidas. Como resultado, las lagunas someras de la región pampeana inmersas en un intenso uso agrícola han sufrido la hipereutrofización de sus aguas debido al impacto de los fertilizantes, caracterizadas por una relación N:P relativamente baja, pasando de un estado de aguas claras, con alta biodiversidad a uno de aguas turbias, con elevado desarrollo del fitoplancton que aumenta la turbidez orgánica del sistema (Quirós *et al.* 2002).

Por otro lado, la introducción de especies exóticas constituye un factor de cambio directo que actúa sobre los ambientes acuáticos naturales. Cuando una especie introducida se expande y crece a un ritmo desmedido se convierte en especie invasora que actúa en detrimento de especies y del ecosistema nativo (Crosby 1986), afectando la biodiversidad, generando cambios en las relaciones tróficas, en el uso de los recursos, modificando el hábitat, así como también puede constituirse como vector de enfermedades (Millenium Ecosystem Assessment 2005). La introducción de especies exóticas en un ambiente, ya sea intencional o accidental, es un fenómeno que se ha visto potenciado durante el siglo XX debido al aumento y diversificación del transporte, a consecuencia de la globalización del intercambio comercial.

iii) Interacción entre factores de cambio

Los factores de cambio no actúan aisladamente, sino por el contrario lo hacen de manera conjunta y a diferentes escalas sobre el ambiente (Christensen *et al.* 2006, Piggott *et al.* 2012, Townsend *et al.* 2008). En este sentido, es sumamente importante estudiar los efectos emergentes de la interacción de dos o más factores como para poder entender el verdadero impacto antropogénico y estimar los costos reales de la actividad del hombre sobre los bienes y servicios de los ecosistemas. La respuesta de la interacción de dos o más factores de cambio puede tener efectos aditivos, siendo el resultado la suma (o resta) de los efectos por separado, o puede generar resultados complejos, con características propias que derivan en respuestas sinérgicas o antagónicas de las diferentes variables de un sistema (Townsend *et al.* 2008). En este sentido, Schneider y Root (2013) discuten cómo el acelerado proceso de calentamiento global y cambio climático interactúa con otros impactos antropogénicos sobre el ambiente, particularmente el uso intensivo de la tierra, generando un efecto sinérgico sobre el ecosistema. Asimismo, Christensen *et al.* (2006) argumentan que los cambios evidenciados en la estructura de las redes tróficas de lagos fríos se explican por la interacción de agentes de estrés ambiental (calentamiento, sequía y acidificación del agua) y no por la suma de sus efectos.

En esta tesis doctoral analizaremos la interacción de dos agentes antropogénicos, el glifosato -agroquímico producido tecnológicamente para mejorar la eficiencia de obtención de alimento- y el molusco invasor *Limnoperna fortunei* -mejillón que llega a la Argentina y a la región como consecuencia de la actividad comercial a través de buques transoceánicos- y su impacto en ecosistemas de agua dulce.

iv) Glifosato

Desde mediados del siglo XX ha habido un cambio en la agricultura con la intención de aumentar el rendimiento por área cultivada (Ramankutty *et al.* 2002), mediante mejoras en los sistemas de riego, en el tipo de agroquímicos y en la introducción de cultivos nuevos que tuvieran mayor eficiencia en el uso de agua y nutrientes. Entre los

cultivos genéticamente modificados, aquéllos con tolerancia al herbicida glifosato son actualmente los más utilizados en todo el mundo (Liphadzi *et al.* 2005).

El glifosato (N-fosfonometilglicina) es un ácido orgánico débil derivado del aminoácido glicina que constituye el principio activo de diferentes herbicidas comerciales aplicados mundialmente tanto en uso agrícola como doméstico, para eliminar plantas anuales y perennes indeseadas. Es un compuesto fosfonato (peso molecular= 169), con fórmula $C_3H_8NO_5P$ (Fig. 1) que contiene tres constantes de disociación ácido-base (pK_a) en medio acuoso (Barja y dos Santos Afonso 1998) (Fig. 2). Los fosfonatos son moléculas que contienen uno o más grupos $R-PO(OH)_2$ y son compuestos muy estables químicamente ya que la unión C-P es altamente resistente a la hidrólisis química, la descomposición térmica, la fotólisis y la acción de fosfatasas (Barja y dos Santos 2005, Hilderbrand 1983, Kononova y Nesmeyanova 2002). El glifosato en el ambiente puede ser degradado por algunas bacterias, cianobacterias y hongos (Araújo *et al.* 2003, Castro *et al.* 2007, Cordeiro *et al.* 1986, Forlani *et al.* 2008, Kononova y Nesmeyanova 2002, Liu *et al.* 1991, Quinn *et al.* 2007, Rueppel *et al.* 1977). Existen dos vías principales por las que el glifosato puede ser metabolizado: la vía metabólica más común consiste en la acción sobre la unión NH-C, dando como producto ácido aminometilfosfónico (AMPA) que puede ser posteriormente degradado a fósforo inorgánico y dióxido de carbono (Franz *et al.* 1997). Por otro lado, algunos microorganismos tienen la capacidad de romper la unión característica de los fosfanatos (C-P) presente en la molécula de glifosato, como también en el AMPA, para utilizarlo como fuente de fósforo. Finalmente, como producto de degradación se libera al medio sarcosina y fósforo inorgánico. Algunas bacterias que fueron identificadas con la capacidad de utilizar el fósforo de la molécula de glifosato son: *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp. y algunos organismos de los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Franz *et al.* 1997). La tasa de disipación del glifosato en los suelos va a depender de la actividad y estructura de la comunidad microbiana del suelo y de factores abióticos como son el pH, la materia orgánica, la temperatura y la humedad del suelo, registrándose una vida media entre 32 y 95 días (Giesy *et al.* 2000).

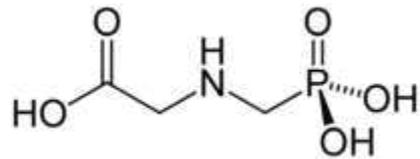


Figura 1: estructura química de la molécula de glifosato

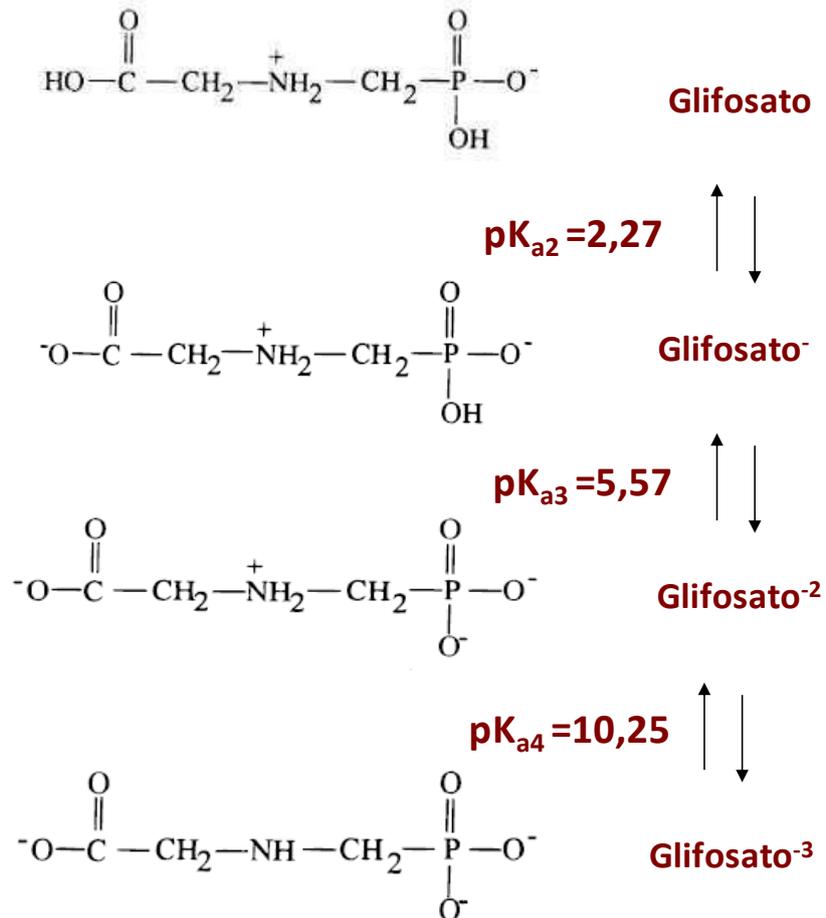


Figura 2: constantes y equilibrios de disociación ácido-base de la molécula de glifosato en medio acuoso.
Fuente: Barja y dos Santos Afonso (1998).

Se trata de un herbicida no selectivo y de amplio espectro, que penetra en plantas post-emergentes a través de las hojas y tallos, distribuyéndose por todo el organismo y actuando a nivel celular. Una vez en la célula, la molécula de glifosato inhibe la actividad de la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) en la ruta del ácido shikímico (Fig. 3), responsable de la formación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (Salisbury y Ross 1994, Williams *et al.* 2000), resultando la muerte celular y la posterior muerte de la planta (Lydon y Duke 1988). La

ruta sintética de dichos aminoácidos aromáticos se encuentra en todas las plantas, en bacterias, algas, hongos y algunos parásitos.



Figura 3: esquema de la vía metabólica del shikimato y mecanismo de acción del glifosato en plantas. El glifosato actúa como un inhibidor de la enzima EPSP sintetasa. Adaptado de Giesy et al. (2000).

Por otro lado, existe otro mecanismo de acción del glifosato que altera la vía metabólica en la síntesis de porfirinas, inhibiendo la conversión de succinil CoA a ácido δ -aminolevulínico (Fig. 4). Dicho mecanismo afecta la producción de clorofilas, citocromos y peroxidasas.

El glifosato posee gran afinidad por las arcillas y los óxidos metálicos presentes en los suelos, especialmente por óxidos de hierro y aluminio (Barja y Dos Santos 1998), como también con el material orgánico (Gimsing y dos Santos Afonso 2005) y al entrar en contacto con ellos puede adsorberse. La adsorción consiste en la acumulación de un compuesto en una interfase como resultado de las interacciones electrostáticas débiles entre el plaguicida, el agua y las partículas del suelo (Volesky 2003). Una vez adsorbido, el glifosato forma un complejo insoluble, evitando su degradación microbiana, quedando retenido en el sistema durante un mayor período de tiempo (Peruzzo et al. 2008).

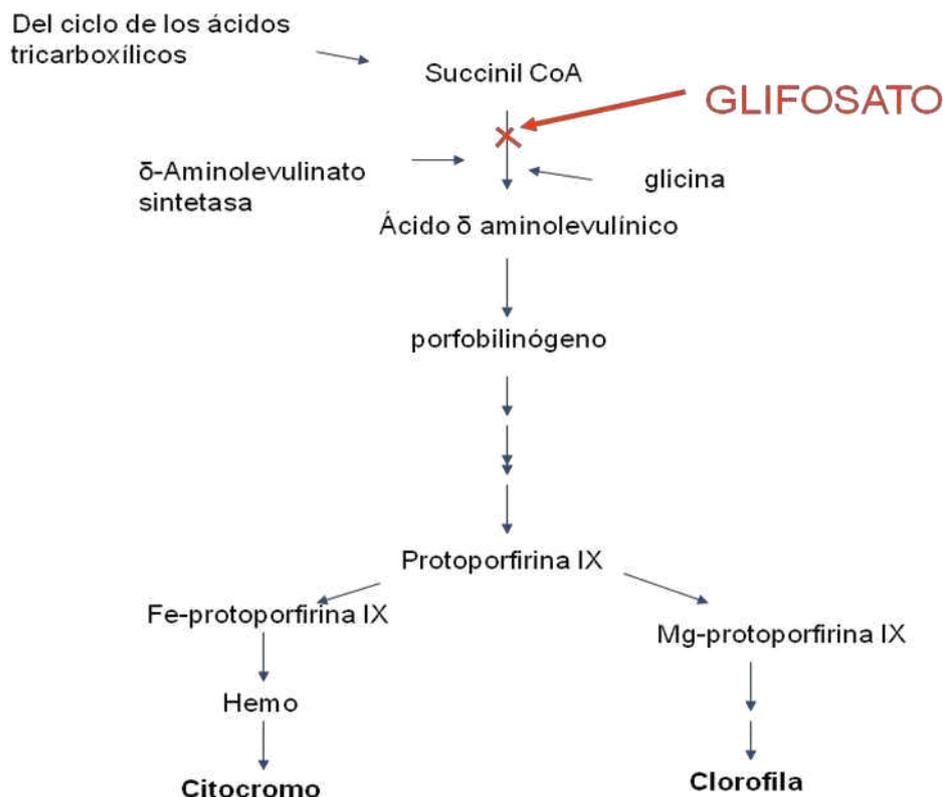


Figura 4: esquema del mecanismo de acción del glifosato en la ruta de las porfirinas.

El producto comercial que se dispone para su uso consiste en formulados que contienen al glifosato como principio activo junto con diversas sustancias como coadyuvantes y surfactantes, necesarias para permitir que el herbicida ingrese en la planta blanco. El glifosato se introdujo en nuestro país en la década de 1970 por la empresa Monsanto® con la comercialización del producto Roundup®. Este formulado contiene 480 g de ingrediente activo (equivalente a 360 g e.a.) por litro y como surfactante a la polioxietilamina (POEA) que es un derivado de ácidos grasos animales (Franz *et al.* 1997). Actualmente, los formulados comerciales a base de glifosato presentan en su mayoría una concentración de entre 480 y 662 g L⁻¹ del principio activo. Si bien las recomendaciones en la mayoría de los marbetes de los productos en venta en nuestro país, como las del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Informe INTA 2012), indican una aplicación de entre 2,5-6 L de formulado por ha, las cantidades reales utilizadas en el campo son mayores debido principalmente a que el productor agropecuario inocula más debido la necesidad de eliminar malezas con resistencias desarrolladas, llegando a valores de hasta 10 L ha⁻¹. Como resultado del excesivo uso de herbicidas, se estima que los ambientes fumigados estarían

soportando una carga aproximada por campaña de entre 120-165 y 480-660 mg de glifosato por m².

En la Argentina actualmente existe un gran número de formulados comerciales (más de 1000 diferentes), siendo el mayor volumen comercializado por las empresas Monsanto, Syngenta, Dow AgroSciences y Atanor, con sus marcas Roundup®, Sulfosato®, Panzer® y Glifosato Atanor® respectivamente. Sin embargo, el tipo de surfactante utilizado en cada fórmula generalmente no se encuentra identificado en los marbetes del producto. Asimismo, el glifosato no es solo utilizado para los cultivos de soja transgénica (soja RR o Roundup Ready) sino también para cultivos de maíz, canola, alfalfa y algodón tolerante, como para la práctica del barbecho químico para la siembra directa. La práctica del “barbecho químico” o “labranza cero” se intensificó con la aparición del glifosato en el mercado (Fig. 5), con el fin de preservar la humedad de los suelos y evitar la erosión (Ronco *et al.* 2008) así como para combatir las malezas más importantes como las gramíneas Sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*) y el gramón (*Cynodon dactylon*) (Pengue *et al.* 2009). Actualmente en nuestro país el uso del glifosato para la siembra directa con barbecho químico es mayor que aquel destinado al cultivo de soja RR, representando un 35% y 31% respectivamente del consumo total de glifosato en el país al año 2009 (CNIA-CONICET 2009). Adicionalmente se lo está utilizando en Colombia, Ecuador y países de la región andina en la lucha contra el cultivo ilegal de la amapola, la coca y otras plantas, involucradas en el proceso de generación de estupefacientes (Solomon *et al.* 2007).



Figura 5: evolución de la superficie con siembra directa en la Argentina entre los años 1977 y 2010, pasando a ocupar de 0,02% a 81% del área cultivada del país para 2010. Fuente: Informe INTA 2011.

De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA 1993), el glifosato fue clasificado como de toxicidad baja, en la categoría III dentro de una escala entre I-IV de mayor a menor toxicidad aguda. Según la EPA, el efecto del glifosato sobre organismos no blanco, como las aves, los mamíferos, los peces y los invertebrados es mínimo. Asimismo, para la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de Alimentación y Agricultura de los Estados Unidos (FAO), el glifosato está clasificado en la categoría de menor riesgo toxicológico (Clase IV) (WHO 1994). En nuestro país, el SENASA en la Resolución 350/99 establece que el glifosato en su uso normal se encuentra dentro del grupo de sustancias activas que posee improbable riesgo agudo para la salud. A pesar de ser inicialmente comercializado como un producto no tóxico y amigable con el ambiente, en 1996 varios científicos independientes se movilizaron para lograr que la corte de Nueva York (EEUU) prohibiera a Monsanto® comercializar sus productos a base del glifosato como “no-tóxico” o “libre de riesgo” (Attorney General NY 1996). Desde entonces existen numerosos trabajos científicos que indican que tanto el Roundup® por un lado, como su principio activo, el glifosato, tienen efectos nocivos sobre organismos no-blanco, demostrando que dicho biocida no es inocuo para la salud, para los animales y para el ambiente en general. Existen estudios que indican que la toxicidad de los surfactantes muchas veces supera a aquella denunciada para el glifosato (Clair *et al.* 2012, Contardo-Jara 2009a, Folmar *et al.* 1979, Tsui y Chu 2003). Se encontró por ejemplo que la lombriz de tierra *Aporrectodea caliginosa* se ve afectada en su crecimiento frente a concentraciones normales de aplicación de glifosato (Springett y Gray 1992), y que la exposición a dosis sub-letales de glifosato afecta el aprendizaje asociativo en abejas *Apis mellifera* (Thomsett Herbert 2013). En presencia del glifosato solo o como formulado comercial, la estructura de comunidades microbianas de agua dulce se ve alterada (Pérez *et al.* 2007, Saxton *et al.* 2011, Vera *et al.* 2010 y 2012); en ensayos se observó que la riqueza específica de renacuajos disminuyó con glifosato (Relyea 2005a) y formulados del herbicida generaron toxicidad en renacuajos de *Rhinella arenarum* (Lajmanovich *et al.* 2011) así como mortandad en renacuajos de *Euflyctis cyanophlyctis* (Yadav *et al.* 2013). Concentraciones menores a 2 mg l⁻¹ afectaron el comportamiento y la mortandad del parásito *Chordodes nobilii* (Achiorno *et al.* 2008); a la vez que Ronco *et al.* (2008) encontraron que en cuerpos de agua dulce los

organismos no-blanco, especialmente los invertebrados, son sensibles a la contaminación con glifosato y otros pesticidas. Si bien es difícil demostrar los efectos sobre la salud humana, existen trabajos sobre anfibios y ratas que sugieren que el glifosato tanto solo como en formulado, suministrado a muy bajas concentraciones (menores a las aceptadas para el consumo humano), altera el desarrollo embrionario de los organismos vertebrados (Paganelli *et al.* 2010, Romano *et al.* 2012). Investigaciones recientes indican que el glifosato podría ser un disruptor endócrino en vertebrados y en mamíferos (Gasnier *et al.* 2009, Seralini *et al.* 2012). Asimismo Zouaoui *et al.* (2013) describen los síntomas que genera la intoxicación aguda con glifosato en humanos, llevando en los casos más graves (6 de 13 pacientes) a la muerte.

La soja transgénica con tolerancia al herbicida glifosato (conocida como soja RR por sus siglas en inglés "Roundup Ready") introducida en Argentina en 1996, fue el primer cultivo genéticamente modificado del mercado mundial (Dill 2005). En el año 2011 se aplicaron 650 millones de toneladas de glifosato en los campos de todo el mundo. La principal producción de soja RR se realiza en Estados Unidos, Brasil y Argentina, representando un 80% de la producción mundial en el 2009 (Meyer y Cederberg 2010). Si bien no hay estadísticas claras sobre el uso del glifosato en Europa, se sabe que es el herbicida más utilizado en Inglaterra (Garthwaite *et al.* 2010), que en Dinamarca representa el 35% del total de todos los pesticidas de uso agrícola (Miljostyrelsen 2010), en Alemania se utiliza en el 39% del área cultivada (Steinmann *et al.* 2012), y en Francia, Rumania y Hungría se utiliza en los cultivos de girasol. En Argentina, la expansión de la frontera agrícola impulsada por el cultivo de soja comenzó en la década del '70, y en la actualidad, más de la mitad del área total dedicada a la agricultura es exclusiva de este cultivo (Aizen *et al.* 2009) (Fig. 6), representando 17,6 millones de hectáreas (campaña 2011/2012, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca) de las cuales más del 98% corresponde a la variedad de soja RR (James 2009, Trigo y Cap 2006). Como resultado, durante el 2007 se utilizaron en nuestro país más de 170 millones de litros de formulado a base de glifosato (CASAFE 2010).

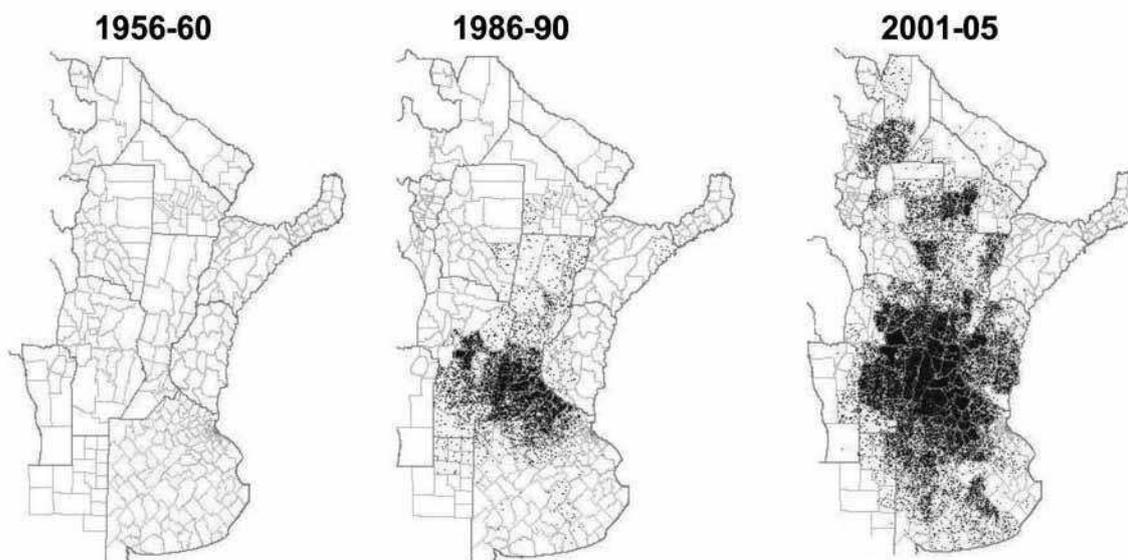


Figura 6: expansión histórica del área de soja en la Argentina. Cada punto equivale a 350 ha. Fuente: Carreño y Viglizzo 2007.

Cuando los cultivos alcanzan un tamaño considerable, la aplicación de agroquímicos se realiza mediante el uso de avionetas, para evitar el daño a la planta que causan los vehículos terrestres. En la región de la llanura pampeana argentina se pueden encontrar innumerables –más de 10.000- cuerpos de agua permanentes tanto lóticos como lénticos de diferente tamaño, la mayoría someros (Dukatz *et al.* 2006). Estos sistemas se encuentran inmersos en un área geográfica en donde el principal tipo de agricultura que se practica es la empresarial, altamente tecnificada, que incluye utilización de grandes cantidades de agroquímicos. Por este motivo, los cuerpos de agua de la región se ven sometidos a recibir una carga semejante de herbicida que los cultivos aledaños por parte de las avionetas u otras máquinas fumigadoras, pudiendo llegar la concentración de glifosato en agua a valores muy superiores a los que figuran en la bibliografía en sistemas acuáticos poco profundos. El herbicida puede alcanzar cuerpos de agua superficiales de manera directa por dispersión, e indirecta, transportado por el viento y el agua de escurrimiento luego de una intensa lluvia (Fig. 7). Asimismo, el lavado de los equipos de fumigación en las acequias y arroyos constituye otra fuente de contaminación por la que el glifosato alcanza cuerpos de agua naturales.



Figura 7: esquema de las formas indirectas en las que el glifosato puede alcanzar cuerpos de agua superficial.

Son muy pocos los trabajos que reportan concentraciones de glifosato en sistemas naturales de agua dulce, sin embargo Relyea (2006) recopila y revisa la información y determina un rango de concentraciones de glifosato encontradas en agua dulce que va desde 1,4 (gobierno de Canadá) a 10,3 mg de glifosato l^{-1} (Mann y Bidwell 1999). En la Argentina Peruzzo *et al.* (2008) señalan concentraciones entre 0,1 a 0,7 mg l^{-1} , mientras que Ronco *et al.* (2008) indican que si bien en ambientes lóticos naturales cercanos a cultivos de soja RR las concentraciones de glifosato encontradas son frecuentemente menores a 0,1 mg l^{-1} , se cuantificó glifosato en un rango entre 1,8 y 10,9 mg l^{-1} . En cuerpos de agua, los cambios del pH y en la disponibilidad de fosfatos pueden facilitar la liberación del glifosato adsorbido en los sedimentos, generando una fuente de contaminación del sistema a largo plazo. Los efectos negativos del glifosato sobre la biota acuática son diversos, generando alteraciones en la estructura de las comunidades microbianas (Pérez *et al.* 2007, Relyea 2005a), pudiendo tener efectos nocivos sobre organismos acuáticos filtradores como algunos crustáceos y moluscos, así como también sobre organismos bentónicos que se alimentan de sedimentos que incluyen diversas especies de peces y anfibios (Folmar *et al.* 1979, Liong *et al.* 1988, Relyea *et al.* 2005, Relyea 2005b). Asimismo, el glifosato interactúa con otros agentes de estrés ambiental, pudiendo presentar efectos complejos sobre la biota. Kelly *et al.* (2010) encontraron que juveniles del pez *Galaxias anomalus* expuestos al herbicida glifosato o al parásito trematodo *Telogaster opisthorchis* por separado no sufrían malformaciones y alteraciones en la supervivencia como lo que se observaba cuando ambos agentes actuaban sinérgicamente sobre el pez. Adicionalmente, Tsui *et al.*

(2005) encontraron que la interacción de tanto el glifosato, como el Roundup®, con metales pesados en agua presentó un efecto antagónico sobre la toxicidad en cladóceros de la especie *Ceriodaphnia dubia*.

v) *Limnoperna fortunei* Dunker (1857)

El mejillón dorado *Limnoperna fortunei* es un bivalvo de agua dulce (Fig. 8) proveniente de las costas del sudeste asiático, introducido accidentalmente en el Río de la Plata, ingresando en Argentina a principios de 1990 mediante el agua de lastre de buques transoceánicos (Pastorino *et al.* 1993) debido al aumento del comercio internacional derivado del fenómeno de globalización económica (Karatayev *et al.* 2006).



Figura 8: valvas de individuo adulto de *Limnoperna fortunei*.

En las costas del Río de la Plata el mejillón dorado encontró condiciones favorables para su supervivencia debido a la falta de competidores y depredadores, dispersándose rápidamente río arriba adherido a los cascos de buques de carga. La invasión avanzó por el Río Paraná a una velocidad promedio de 250 km año⁻¹, como también por el Río Uruguay, aunque a una velocidad menor, a un promedio de 30 km año⁻¹ (Boltovskoy *et al.* 2006). *Limnoperna fortunei* alcanzó la costa del Río de la Plata en 1991 y por actividad antrópica se dispersó río arriba por el río Paraná registrándose su presencia en Paraguay para el año 1997. Continuó su dispersión por los ríos Paraná y Uruguay, encontrándose para el año 2000 en cuerpos de agua de Brasil y de Uruguay.

Por otro lado, en 1999 se informó su aparición en la costa de Porto Alegre, Brasil (Figs. 9 y 10). Actualmente, a más de 20 años de su ingreso en América del Sur, esta especie domina ampliamente la fauna bentónica de prácticamente todo el sistema del Paraná-Río de la Plata (Argentina, Uruguay, Brasil y Paraguay), alcanzando densidades de más de 200.000 individuos por metro cuadrado (Boltovskoy *et al.* 2006). *Limnoperna fortunei* es una especie dioica, con un ciclo de vida que incluye un estado larval planctónico y un adulto sésil. Las gametas de ambos sexos son liberadas a temperaturas mayores de 16°C (Darrigran y Damborenea 2006), para que en el plancton se desarrollen diferentes estadios larvales de vida libre. En la cuenca del Plata el mejillón dorado se reproduce ininterrumpidamente durante 9 a 10 meses por año (Boltovskoy y Cataldo 1999). Una vez formada la mórula, deviene en la larva trocófora, luego pasa a un estado larval con valvas (larva velígera), posteriormente se despliega el pie con el que se va a fijar al sustrato (larva plantígrada), completándose la metamorfosis aproximadamente a los 15 días (a 25°C) luego de la fertilización en donde se convierte en un adulto sésil (Fig. 11). La tasa del desarrollo larval se ve acelerada a temperaturas más altas (evaluado hasta los 28°C) (Cataldo *et al.* 2005).

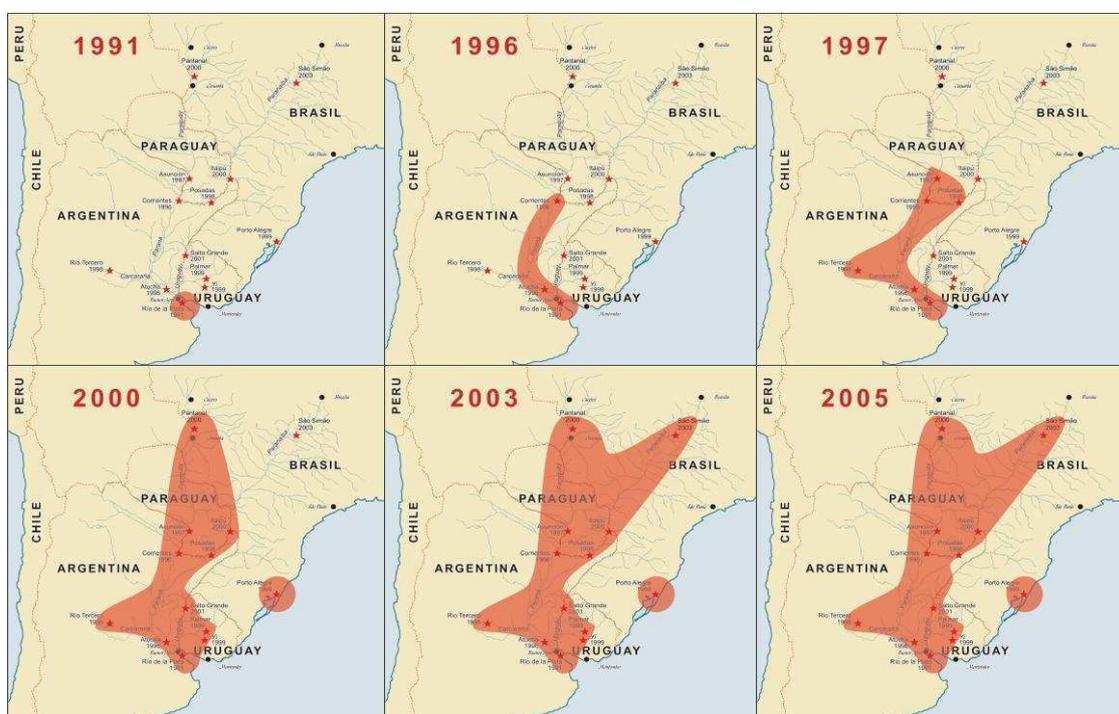


Figura 9: avance en el área de dispersión de la especie invasora de mejillón *Limnoperna fortunei* entre los años 1991 y 2005 en la cuenca del Plata y otras interiores, tomado de Boltovskoy *et al.* 2006.



Figura 10: rango de dispersión de la especie invasora de mejillón *Limnoperna fortunei* al año 2010 en la cuenca del Plata y otras interiores Fuente: Dr. Daniel Cataldo.



Figura 11: ciclo de vida del mejillón dorado *Limnoperna fortunei*.

El adulto de *Limnoperna fortunei* vive adherido a sustratos duros (naturales o artificiales) mediante filamentos proteicos denominados biso (Fig. 12), alimentándose mediante la filtración de materia orgánica suspendida y disuelta en el agua. Los hábitos y características generales de *L. fortunei* son semejantes a los del molusco cebra,

Dreissena polymorpha, especie invasora de Europa occidental desde hace 200 años y América del Norte desde 1987: muy altas tasas de reproducción, tamaño reducido, ubicuidad, adaptabilidad y adulto sésil (Sylvester *et al.* 2005). Asimismo, los hábitos alimenticios de ambas especies y la excreción de heces y pseudoheces (material filtrado pero no ingerido por el bivalvo) hacen que, al sedimentar los productos de excreción, se altere la dinámica de los nutrientes, transfiriendo parte de la materia orgánica de la columna de agua hacia el bentos (Karatayev *et al.* 1997).

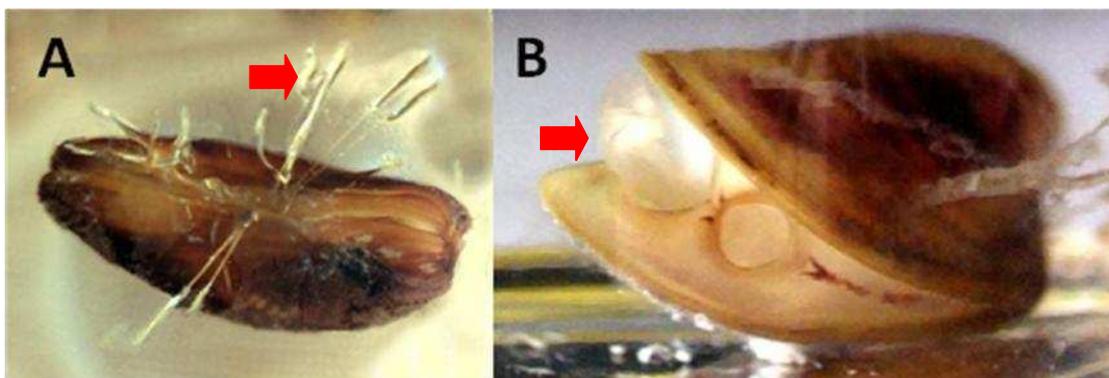


Figura 12: individuos vivos de *Limnoperna fortunei* donde se observa el biso (flecha) con el que se adhiere a sustratos duros (A) y el sifón (flecha) con el que realiza la filtración (B).

El crecimiento incontrolado de las poblaciones de *Limnoperna fortunei* ha colonizando superficies artificiales como cañerías, rejillas, intercambiadores de calor de las plantas industriales que utilizan aguas naturales de ríos o lagos en sus procesos (Fig. 13), así como también cascos y sistemas de refrigeración de motores de embarcaciones de la cuenca del Plata, generando graves problemas económicos. Se han realizado múltiples trabajos para encontrar la manera más eficiente de erradicar los mejillones y poder minimizar los perjuicios del invasor (Cataldo *et al.* 2003). Asimismo, debido a su alta tasa de filtración, que puede alcanzar valores de hasta 350 ml hora⁻¹ individuo⁻¹ (Sylvester *et al.* 2005), *L. fortunei* produce importantes impactos en los ecosistemas que habita, pudiendo modificar su estructura y funcionamiento (Boltovskoy *et al.* 2009a). Los efectos del mejillón son múltiples, incluyendo el aumento en la transparencia del agua, alteraciones en las poblaciones de fanerógamas acuáticas, impacto sobre la densidad del bacterioplancton, zoobentos y peces, cambios estructurales en comunidades bentónicas y nectónicas, disminución de la concentración de seston y del fitoplancton, modificación en la producción primaria del fitoplancton, y alteración en la disponibilidad de oxígeno disuelto y nutrientes. Por

todas estas características, *L. fortunei* es considerado un “ingeniero de ecosistemas”. Recientemente Cataldo *et al.* (2012a) publicaron resultados en los que demuestran que poblaciones del molusco pueden aumentar las floraciones del género de cianobacterias potencialmente tóxicas como *Microcystis*, en microcosmos de 400 litros colocados "in situ" en el lago de la represa Salto Grande, emplazada en el río Uruguay. Si bien existen algunos trabajos en los que se reporta al mejillón dorado como organismo biomonitor de diversos contaminantes de origen industrial, urbano y rural en sistemas naturales (Belaich *et al.* 2006, Contardo-Jara *et al.* 2009b, Villela *et al.* 2006 y 2007), hasta el momento no se conocen estudios que evalúen el impacto de *L. fortunei* frente a xenobióticos orgánicos en general y específicamente al glifosato, en particular incluyendo un posible papel en biorremediación.

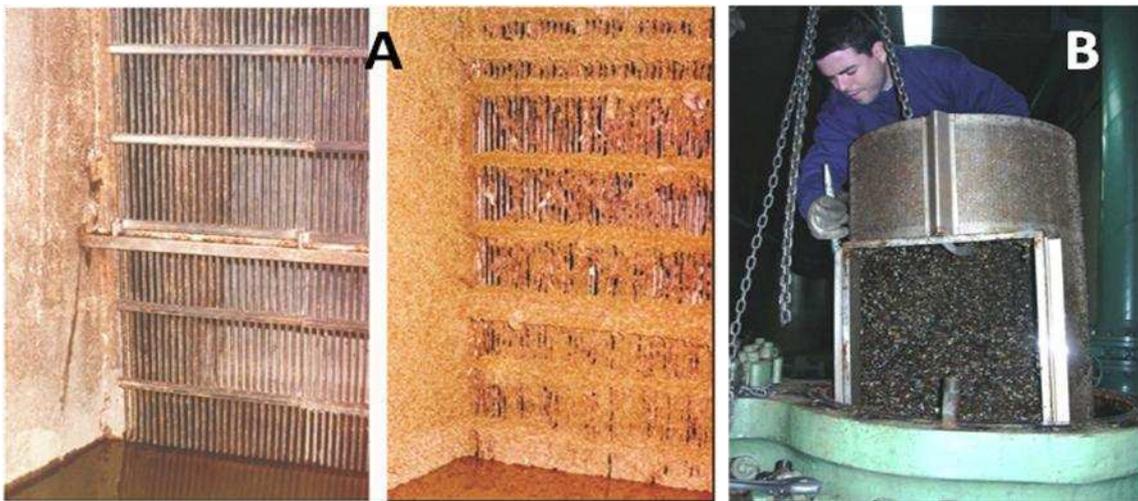


Figura 13: (A) rejas de entrada de agua de la Central Nuclear Atucha I (foto de la izquierda limpias y la de la derecha cubierta de individuos de *Limnoperna fortunei*). (B) operario limpiando los mejillones adheridos a uno de los filtros del sistema de refrigeración de las turbinas de la central hidroeléctrica de Salto Grande. Fuente: Dr. Daniel Cataldo.

Objetivo General

Objetivo general del trabajo de tesis doctoral

El objetivo general de la tesis consiste en el estudio del efecto de la interacción de dos factores de cambio en ecosistemas de agua dulce introducidos por la actividad humana: el herbicida glifosato y el molusco invasor *Limnoperna fortunei*. Se trabaja en el análisis del efecto conjunto del glifosato y *L. fortunei* sobre la estructura de las principales comunidades microbianas y sobre la calidad del agua en general. Las aproximaciones se realizan mediante experimentos en microcosmos, en condiciones de laboratorio (Sección I) y al aire libre, para simular cuerpos de agua lénticos (Sección II).

Sección I

Estudio de la interacción del glifosato
y del mejillón *Limnoperna fortunei*
en ensayos de laboratorio

Introducción

i) El glifosato en agua

El glifosato si bien es mayormente utilizado en ambientes terrestres, frecuentemente alcanza cuerpos de agua dulce superficiales (lagunas, lagos y ríos), debido tanto a la dispersión por viento durante la fumigación, como al escurrimiento de agua superficial luego de una intensa lluvia. La evolución y la vida media del glifosato en agua dulce variarán según las características físico-químicas y biológicas del sistema (Goldsborough y Beck 1989). De acuerdo a la bibliografía, la vida media del glifosato disuelto en ecosistemas de agua dulce puede variar entre 7 y 70 días dependiendo de las condiciones del ambiente (Giesy *et al.* 2000). En sistemas naturales, la rápida disipación del glifosato en la columna de agua se debe principalmente a la alta capacidad de la molécula de glifosato de adsorberse a los sólidos en suspensión, para luego precipitar al sedimento junto con ellos. Al formar un complejo insoluble, la degradación del glifosato por parte de los microorganismos se ve reducida y por lo tanto el herbicida permanece en el sistema un período de tiempo mayor al establecido según su vida media. De acuerdo a los cambios físico-químicos del entorno, con el tiempo el herbicida se irá desorbiendo del sedimento, volviendo a encontrarse disuelto en la columna de agua (Barja y dos Santos 2005). En cuerpos lénticos de la pampa húmeda argentina, zona con una intensa actividad agrícola empresarial, las características iónicas de sus aguas generan tiempos de vida media del glifosato menores al rango establecido en bibliografía, con valores promedio de 4,2 días (Vera *et al.* 2010) y de 5,7 a 7,3 días (Pérez *et al.* 2007). En ambos casos se realizaron experimentos en mesocosmos que contaban con sedimentos tomados de la región cercanos a la laguna de Chascomús, Pcia. de Buenos Aires, que fueron agregados al fondo de los mesocosmos experimentales para simular las lagunas someras de la región, acentuando la disipación del glifosato del agua por adsorción a las arcillas y metales en los suelos. En otro experimento reportado por Vera *et al.* (2012) en cambio, en donde no hubo adición de sedimentos y se utilizaron microcosmos de menor volumen (90 litros) para simular charcas temporarias, la vida

media del glifosato fue mayor, con un promedio de 16 días. En aguas más alcalinas, Goldsborough y Brown (1993) informaron una vida media del glifosato de 11,2 días en estanques de bosques boreales.

El glifosato, tanto aislado como mezclado con aditivos en formulados, afecta no solamente a la flora por su efecto herbicida en los ecosistemas de agua dulce, sino que también influye en su fauna, de forma directa y/o indirecta. Existen diversos trabajos que indican efectos negativos del herbicida sobre comunidades de invertebrados y de vertebrados de agua dulce. Tate *et al.* (1997) informan que el crecimiento corporal del caracol de agua dulce *Pseudosuccinea columella* se perturba a concentraciones de glifosato superiores a 10 mg l⁻¹. Por otro lado, la tasa de supervivencia del crustáceo *Hyalella castroi* se ve reducida, como también se altera su reproducción luego de una exposición durante una semana a concentraciones de Roundup® de entre 0,36 y 2,16 mg l⁻¹ de principio activo (Dutra *et al.* 2011). En vertebrados, existen estudios que indican que la carpa común (*Cyprinus carpio*) (Szarek *et al.* 2000) y la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Jiraungkoorskul *et al.* 2002 y 2003) a concentraciones subletales de glifosato sufren daños en tejidos y órganos. Menéndez Helman *et al.* (2012) identificaron efectos subletales del glifosato en madrecitas de agua *Cnesterodon decemmaculatus* analizando biomarcadores de respuestas antioxidantes y de neurotoxicidad. Adicionalmente, Menéndez Helman (2013) registró en pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) frente a una exposición crónica a un formulado a base de glifosato, efectos a nivel del metabolismo energético, y un aumento en la mortalidad de las larvas. En sábalos (*Prochilodus lineatus*) la exposición aguda a concentraciones subletales de Roundup® (< 13,7 mg l⁻¹) provocaron respuestas antioxidante, de estrés y cambios en el tejido hepático (do Carmo Langiano y Martinez 2008). Por otra lado, la exposición aguda de la boga (*Leporinus obtusidens*) a concentraciones de glifosato menores a 20 mg l⁻¹ generaron alteraciones en indicadores metabólicos y hematológicos (Gluszczak *et al.* 2006). Asimismo la exposición continua de anfibios a concentraciones de glifosato en un rango entre 3,8 y 18 mg l⁻¹ deviene en efectos nocivos sobre estos (Howe *et al.* 2004, Relyea 2005a y 2005b).

ii) Bivalvos

Los moluscos bivalvos, por ser organismos filtradores, suelen ser susceptibles a los xenobióticos presentes en el agua y muchas veces actúan como bioacumuladores de sustancias tóxicas (Dreher Mansur *et al.* 2012). En bivalvos, Mottier *et al.* (2013) identificaron efectos adversos en el desarrollo larval y en la metamorfosis tanto del glifosato puro, como de su principal producto de degradación (AMPA) y de dos formulados a base de glifosato en la ostra japonesa *Crassostrea gigas*. Si bien Giesy *et al.* (2000) indican que tanto el glifosato como su formulado comercial más conocido, el Roundup®, no se bioacumulan en animales, Wang *et al.* (1994) indican que habría acumulación de glifosato en la carpa y la tilapia. No obstante, la realidad es que existen pocos trabajos que evalúan esta problemática, implicando un alto riesgo ecológico y sanitario debido a la posible magnificación en las concentraciones de glifosato en tejido animal en las redes tróficas. Se encontró, por ejemplo, que la almeja asiática *Corbicula fluminea*, especie invasora que llegó a los ríos Paraná y Río de la Plata en 1970, puede acumular y concentrar en sus tejidos contaminantes ambientales -PCB, pesticidas clorados y metales pesados- siendo un buen indicador de contaminación del agua de los ríos que habita (Colombo *et al.* 1995, Doherty 1990). Asimismo, el mejillón cebra *Dreissena polymorpha*, invasor de los grandes lagos de los Estados Unidos, que comparte muchas características ecológicas con *Limnoperna fortunei* (Karatayev *et al.* 2007, Sylvester *et al.* 2005), es una especie biomonitorea de las concentraciones de metales pesados en el agua debido a su capacidad de acumularlos en sus tejidos (Blackwell *et al.* 2013, Camusso *et al.* 2001, Villar *et al.* 1999). Existen estudios que utilizan a la especie *L. fortunei* como biomarcador de agentes contaminantes en cuerpos de agua naturales a través del estudio de indicadores fisiológicos del organismo (Contardo-Jara *et al.* 2009b, Villela *et al.* 2007), pero hasta el momento no hay resultados que señalen al mejillón dorado como un posible biorremediador.

Al ser organismos sésiles, los mejillones en general son buenos centinelas ambientales, conservando en sus tejidos "información" sobre la historia de contaminantes del lugar. Sin embargo, como no pueden desplazarse, si las condiciones ambientales se tornan desfavorables, los mejillones tiene la capacidad de evadir sustancias tóxicas evitando la filtración mediante el cerrado de sus valvas, pudiendo

permanecer hasta un mes en inanición (Cataldo *et al.* 2003). Las valvas no solo protegen al organismo de depredadores y de desecación cuando quedan expuestos al aire frente a los cambios hídricos del sistema, sino que les permite evitar que agentes nocivos en el agua puedan entrar a la cavidad del manto y afectar su metabolismo. Para esto, el mejillón debe reconocer al xenobiótico como peligroso, y esto probablemente dependa no solo de la identidad del contaminante sino también de la concentración en que este se encuentre en la columna de agua. El proceso de filtración realizado por los mejillones consiste en tres pasos: (1) la retención de las partículas en la columna del agua que entran a la cavidad del manto por el movimiento de las cilias en las branquias; (2) la ingesta del material retenido y (3) la asimilación de aquello que sirva como fuente de energía. Mientras la gran mayoría de las partículas, muchas inorgánicas, no se pueden aprovechar como alimento y son eliminadas como pseudoheces, el bivalvo va a asimilar y alimentarse del zoo y fitoplancton, de las bacterias y de materia orgánica tanto particulada como disuelta en la columna de agua (Dillon Jr. 2004). A pesar de la alta resistencia de los bivalvos frente a agentes contaminantes, estudios sobre juveniles y adultos de *Corbicula fluminea* tanto en ambientes naturales como en laboratorio indicaron que los organismos sufren toxicidad y mortandad de juveniles frente a concentraciones elevadas de sustancias químicas provenientes de desagües industriales (Zn, Cu, Cr y compuestos aromáticos) (Boltovskoy *et al.* 1997, Cataldo *et al.* 2001).

iii) Biofilm en las valvas

Toda superficie sumergida en agua, tanto de mar como dulce, se encuentra tapizada por una comunidad adherida de microorganismos autotróficos y heterotróficos, inmersos en una matriz extracelular. Esta comunidad, que llamamos biopelícula o biofilm, conforma un micro-ecosistema compuesto por hongos, bacterias, algas y organismos procariotas, que viven adheridos sobre una superficie viva o inerte, con interacciones complejas mediadas por la matriz de polisacáridos en la que se encuentra inmersa (Bricheux *et al.* 2013). En este sentido, la cara externa de las valvas del mejillón *Limnoperna fortunei* se encuentra tapizada por biofilm cuyas características estructurales dependerán de muchos factores, intrínsecos y extrínsecos

al propio biofilm. Dentro de los componentes más importantes del biofilm, las bacterias suelen conformar el grupo dominante, algunas de las cuales podrían degradar al glifosato dada su potencial capacidad (Castro *et al.* 2007, Liu *et al.* 1991, Rueppel *et al.* 1977). Hasta el momento no se conocen trabajos que analicen la estructura y la funcionalidad del biofilm desarrollado sobre valvas de los mejillones de agua dulce en general y tampoco sobre su posible capacidad biodegradadora de glifosato.

Objetivo

El **objetivo general** del trabajo de esta Sección consiste en evaluar la capacidad de *Limnoperna fortunei* en reducir la concentración de glifosato (en su forma ácida, 95% puro) disuelto en agua dulce, mediante ensayos de laboratorio. Para llevarlo a cabo se plantearon los siguientes **objetivos específicos**, utilizando microcosmos en condiciones controladas de laboratorio:

- (1) Estudiar la respuesta evasiva del mejillón dorado *Limnoperna fortunei* frente a diferentes concentraciones de glifosato analizando el comportamiento de apertura de valvas, en ensayos de corta duración.
- (2) Evaluar el efecto letal del glifosato, aplicado a distintas concentraciones, sobre organismos adultos del mejillón mediante ensayos semi estáticos agudos y crónicos evaluando la mortalidad de los mejillones, en experimentos de corta duración.
- (3) Registrar el potencial degradador del molusco sobre el glifosato disuelto en agua de red declarada, diferenciando individuos de talla pequeña y grande, exponiendo a los organismos a distintas concentraciones de glifosato y evaluando la evolución de la concentración del herbicida en el agua y de nutrientes disueltos, en ensayos de larga duración.
- (4) Analizar el aporte del complejo valva-biofilm en la posible degradación del glifosato, mediante la evaluación comparativa de la acción de individuos completos del mejillón y de sus valvas por separado, en ensayo de larga duración, en agua declarada.
- (5) Evaluar la diferencia en los ensayos del punto (3) y (4) realizados en agua declarada de red y agua de río tomada del mismo sitio de procedencia de los moluscos.

Hipótesis

Las hipótesis planteadas para los objetivos específicos propuestos son:

- (1) *Limnoperna fortunei* presenta una respuesta de evasión cerrando sus valvas, frente a concentraciones superiores a 10 mg l^{-1} de glifosato en agua.
- (2) El glifosato afecta la tasa de mortalidad de los mejillones expuestos a altas concentraciones de herbicida.

- (3) La concentración de glifosato en agua se reduce frente a la presencia del mejillón *Limnoperna fortunei*.
- (4) La tasa de disipación del glifosato depende de la talla de *Limnoperna fortunei*.
- (5) No hay aporte del complejo valva-biofilm en el efecto del mejillón *Limnoperna fortunei* sobre la concentración de glifosato disuelto en agua.
- (6) El impacto del molusco sobre el glifosato depende del tipo de agua en el que se analice.

Los resultados de esta sección han sido publicados en Di Fiori *et al.* 2012.

Metodología

Los ensayos se realizaron en pequeños acuarios de 2 l de volumen, en condiciones controladas de laboratorio. Los ejemplares de *Limnoperna fortunei* se recolectaron manualmente en el tramo inferior del delta del Río Paraná en su desembocadura con el Río de la Plata, San Fernando, Provincia de Buenos Aires (34°25'34"S, 58°32'36"O), durante un período de marea baja, donde generalmente se los puede encontrar adheridos a todo tipo de sustratos duros naturales o artificiales. Los organismos recolectados fueron separados cuidadosamente del sustrato y llevados de inmediato a laboratorio. Allí fueron dispuestos en acuarios con agua de red declorada durante un período de una semana para su aclimatación a una temperatura de 24 ± 1 °C, luz natural y aireación continua. Se alimentó a los mejillones diariamente con alimento para larva de peces "baby fish food" (VitaFish®). Luego de su aclimatación, los mejillones fueron trasladados a bandejas con agua de red declorada y aireada, seleccionando para el estudio aquéllos animales que al contacto con el agua abrían inmediatamente sus valvas, extendían sus sifones y comenzaban a desarrollar una filtración activa.

Los experimentos de laboratorio para analizar la interacción del mejillón *Limnoperna fortunei* y del glifosato fueron llevados a cabo en dos etapas. En primer lugar se analizó el efecto que pudiera tener el glifosato sobre el mejillón, mediante ensayos cortos de respuesta evasiva y ensayos de toxicidad evaluando mortandad. Como segunda etapa se llevaron adelante dos experimentos a largo plazo (3 semanas de duración) para analizar la potencial acción degradadora de *L. fortunei* sobre una concentración determinada de glifosato en agua, analizando el efecto del tamaño de los individuos y el efecto del complejo valva-biofilm en dicha interacción.

i) Respuesta evasiva de *L. fortunei* y ensayos de toxicidad

Se evaluó el **comportamiento evasivo** de los mejillones frente al glifosato, un agente potencialmente perjudicial para el organismo. Por ser organismos sésiles, cuando los quimiorreceptores presentes en el manto del bivalvo detectan algún agente nocivo, el mecanismo de evasión consiste en el cierre hermético de sus valvas.

Para analizar este potencial efecto, se utilizaron 120 organismos adultos de *Limnoperna fortunei* que fueron dispuestos al azar en grupos de 30 individuos en bandejas blancas con agua de red de clorada y aireada, expuestos a cuatro concentraciones de glifosato (forma ácida, 95% puro): 0, 10, 20 y 40 mg l⁻¹. Durante dos horas se registró cada 10 minutos el número de mejillones con valvas abiertas y sifones extendidos, es decir, que estuvieran desarrollando una filtración activa, y se calculó el porcentaje de mejillones que cerraran sus valvas en presencia de glifosato para cada una de las concentraciones utilizadas (Fig. 14 A).

Posteriormente se procedió a evaluar la **toxicidad** del herbicida sobre los organismos, registrando la mortandad de los mejillones durante diez días de exposición al glifosato. Para esto, se dispusieron al azar 10 individuos en recipientes de 2 litros (unidades experimentales) (Fig. 14 B y 14 C), expuestos a una de las cuatro concentraciones de glifosato (forma ácida, en grado técnico) utilizadas: 0, 10, 20 y 40 mg l⁻¹, cada una por triplicado (Fig.15). Los mejillones no fueron alimentados durante el ensayo y fueron provistos de aireación continua. Durante los primeros tres días se realizó diariamente el recambio total del agua de cada recipiente para asegurar una concentración constante del glifosato al que fueran expuestos los mejillones, evaluando **toxicidad aguda**. Se registró el número de individuos muertos por acuario a las 24, 48 y 72 hs. Para evaluar **toxicidad crónica** sobre *Limnoperna fortunei*, se continuó el ensayo durante una semana más, sin recambio de agua, y se contabilizó el número de organismos muertos por acuario a los días 6, 8, 9 y 10 de exposición al herbicida. Se consideraba a un animal muerto cuando sus valvas se encontraban parcial o completamente abiertas y no se observaban respuestas de cierre de las mismas ni contracción de los sifones ante estímulos mecánicos por medio de suaves contactos con una aguja entomológica. En la mayoría de estos casos los tejidos blandos del animal ya se encontraban deteriorados o ausentes.



Figuras 14, A, B y C: (A) individuos de *Limnoperna fortunei* dispuestos en bandejas con agua de red declarada y aireada, expuestos a distintas concentraciones de glifosato para evaluar la respuesta de evasión de los mejillones; (B y C) disposición de mejillones en acuarios de 2 litros para el ensayo de toxicidad.



Figura 15: ensayo de toxicidad en acuarios de 2 litros con 10 individuos de *Limnoperna fortunei* cada uno expuestos a distintas concentraciones de glifosato (0, 10, 20 y 40 mg l⁻¹) por triplicado.

ii) Efecto de *L. fortunei* sobre la concentración de glifosato en agua

En esta segunda etapa se llevaron a cabo dos experimentos de 21 días de duración, uno para analizar el efecto del tamaño de los individuos y el otro para evaluar el efecto del complejo valva-biofilm y de la calidad del agua, para los cuales se seleccionaron nuevamente mejillones en buen estado: aquéllos que al ser trasladados a bandejas con agua limpia respondieran rápidamente realizando una filtración activa. Dichos ensayos fueron llevados a cabo en condiciones controladas de temperatura a 24 ± 1 °C.

a) Impacto de la talla de *L. fortunei* sobre la disipación de glifosato en agua

Se realizó un ensayo en laboratorio para analizar el decaimiento de una concentración determinada de glifosato en ausencia (control, C) y presencia de *Limnoperna fortunei*, para dos tallas distintas de mejillón: mejillones pequeños (Lf P), con talla media de 13 ± 1 mm; y mejillones grandes (Lf G), con talla media de 22 ± 1 mm. Los mejillones fueron seleccionados según su longitud máxima, medida con un calibre digital (marca Sylvac) de precisión a 0,01 mm. Se dispusieron 20 individuos de cada talla en acuarios de 2 litros, con agua de red declorada y aireación continua, con una concentración inicial de glifosato (ácido, 95% puro) de 20 mg l^{-1} . Cada tratamiento (C, Lf P y Lf G) se realizó por triplicado, contando en total con 9 acuarios. Los mejillones fueron hambreados 24 hs previas al ensayo y durante el experimento, para eliminar contaminación externa derivada de las heces y pseudoheces excretadas por los mejillones. En función de los resultados de los ensayos de toxicidad (ver pág. 35) se decidió utilizar para el presente experimento una concentración de glifosato de 20 mg l^{-1} ya que se observó que no tenía efecto en el comportamiento evasivo ni en la tasa de mortalidad de los mejillones. Consideramos que para evaluar la posibilidad de que *L. fortunei* utilizara el glifosato como fuente de alimentación el herbicida debía estar en exceso y como única oferta alimenticia. Asimismo, esta concentración representa el peor de los escenarios posibles de las concentraciones de glifosato que pueden encontrarse en sistemas naturales luego de una aplicación directa del herbicida (e.g. mediante aplicación aérea), una práctica agrícola muy común en Argentina como en otros países de la región (Vera *et al.* 2010).

Se tomaron muestras de agua (50 ml) a los días 1, 2, 4, 8, 14 y 21, para cuantificar la concentración de glifosato disuelto en cada acuario. Una vez concluida la experiencia y por acuario, se sacrificó y diseccionó cada mejillón, se extrajo el tejido blando y se secó en estufa a 60°C hasta peso seco constante. En cada tratamiento con *L. fortunei* (Lf P y Lf G) se estimó la tasa de disipación de glifosato por peso seco de mejillón para cada talla, expresado como milimoles de glifosato disipados en agua por gramo de tejido blando seco por día.

b) Relación de las valvas de *L. fortunei* y de la calidad del agua con la disipación de glifosato en agua

Se llevó a cabo un segundo experimento con el fin de estudiar el aporte del complejo valva-biofilm (valvas-biofilm vs. mejillón entero) en la disipación del glifosato y el efecto del medio de incubación (agua declorada vs. agua de río). Al comparar la evolución del experimento en agua de río proveniente del mismo sitio donde fueran recolectados los mejillones (pH 7,5) y del agua de red declorada (pH 7,6), se tuvo la intención de evaluar posibles diferencias en la respuesta del mejillón frente a un medio de incubación natural y uno artificial. En la Tabla 2 se incluyen características del agua de la parte inferior del delta del Río Paraná cercana al sitio donde fueron tomados los mejillones y el agua utilizada en los ensayos (según do Cabro *et al.* 2003).

Para este objetivo, se repitió el experimento anterior, pero utilizando solamente mejillones de talla grande, y agregando un tratamiento control. El diseño experimental fue de dos factores: (1) mejillón y (2) medio de incubación. El factor mejillón contó con cuatro niveles (+Lf, Gli, Val + Gli y Lf + Gli) y el medio de incubación con dos (agua de red y agua de río), obteniéndose un total de 8 tratamientos (Tabla 1), cada uno por triplicado. En los tratamientos con mejillón (Lf), se utilizaron 20 individuos adultos de *Limnoperna fortunei*; en los que se consideraron las valvas (Val) se agregaron 20 pares de valvas vacías de *L. fortunei* adulto. Las valvas fueron obtenidas de mejillones adultos que fueron recolectados y aclimatados con el resto de los mejillones vivos utilizados, y fueron cuidadosamente diseccionados el mismo día en que se comenzó con el experimento para conservar intacta la comunidad microbiana del biofilm adherido a sus valvas. En las unidades experimentales correspondientes se agregó glifosato (Gli) para llegar a la concentración inicial de 16 mg l⁻¹ de glifosato ácido (95% puro).

	Glifosato	<i>L. fortunei</i>	Glifosato + 20 pares de valvas de <i>L. fortunei</i>	Glifosato + 20 organismos de <i>L. fortunei</i>
Agua de red declarada (RED)	Gli ^{RED}	Lf ^{RED}	Gli + Val ^{RED}	Gli + Lf ^{RED}
Agua del Río de la Plata (RIO)	Gli ^{RIO}	Lf ^{RIO}	Gli + Val ^{RIO}	Gli + Lf ^{RIO}

Tabla 1: nomenclatura de los 8 tratamientos en el experimento realizado en laboratorio en acuarios de 2 litros, durante 21 días de duración. La concentración inicial de glifosato resultó ser de $16,0 \pm 0,2 \text{ mg l}^{-1}$ para agua declarada y de $15,5 \pm 0,3 \text{ mg l}^{-1}$ en agua de red.

Se tomaron muestras de agua a los días: 0, 1, 2, 4, 8, 14 y 21. Para cada tiempo se cuantificó además de la concentración de glifosato en agua, la concentración de nutrientes inorgánicos disueltos: nitrógeno del nitrito+nitrato (N-NO_2^- y N-NO_3^-), nitrógeno del amonio (N-NH_4^+) y del fósforo reactivo soluble (P-PO_4^{3-}).

Variable	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Oxígeno disuelto (mg l^{-1})	N-NH_4^+ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	N-NO_3^- ($\mu\text{g l}^{-1}$)	SRP ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Fitoplancton total (células ml^{-1})	Zooplancton total (individuos ml^{-1})
Rango	6,7-7,2	113-126	6,1-6,4	27-31	178-218	57-65	344-595	14-32

Tabla 2: características físico-químicas y biológicas del agua en la parte inferior del delta del Río Paraná, según do Cabro et al. (2003).

iii) Análisis de muestras

Los nutrientes disueltos fueron determinados, a partir de muestras de agua filtradas previamente con filtros de fibra de vidrio tipo Whatman®GF/F, con un espectrofotómetro portátil Hach® DR/2010 (Hach Company, USA) utilizando los reactivos Hach® correspondientes. El fósforo reactivo soluble (P-PO_4^{3-}) se analizó empleando el método de ácido ascórbico, el nitrato + nitrito ($\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$) según el método de reducción con cadmio (Mackereth *et al.* 1978) y el amonio (N-NH_4^+) según el método del salicilato (APHA 2005), con un límite de detección de $0,001 \text{ mg l}^{-1}$. La determinación de glifosato en agua se realizó mediante columna de cromatografía de intercambio iónico AS4-AG4 en un cromatógrafo DIONEX DX-100. Previamente cada muestra se filtró por $0,45 \mu\text{m}$ para evitar dañar la columna. Se utilizó un *loop* de $25 \mu\text{l}$ de muestra (Pessagno *et al.* 2008), con un límite inferior de detección de aproximadamente $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de glifosato y un error experimental menor al 5%. Como eluyente se utilizó una mezcla de $\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 4 mM/9 mM a un flujo de 2 ml min^{-1} .

Para cada tratamiento se realizó un ajuste a una función logarítmica asumiendo una cinética de primer orden para calcular la vida media del herbicida bajo las diferentes condiciones. La ecuación utilizada fue: $G_{\text{tiempo final}} = G_{\text{tiempo inicial}} * e^{-kt}$; donde G_{li} es la concentración de glifosato a un tiempo determinado, k es el coeficiente de disipación y t es el tiempo.

Una vez finalizado el experimento, se sacrificaron los mejillones, se los diseccionó y se calculó el peso seco del tejido blando de todos los individuos de *Limnoperna fortunei* para cada acuario mediante el secado en estufa (a 60°C) hasta peso constante, usando una balanza digital KERN modelo ARS 120-4 (error 0,0001 g). El peso seco de los mejillones se calculó para estimar la tasa de excreción del fósforo reactivo soluble expresado como micromoles de fosfato excretado por gramo de tejido blando seco por día.

iv) Análisis estadístico

Tanto en el experimento que evaluó el efecto del tamaño de *Limnoperna fortunei*, como el que evaluó el efecto del complejo valva-biofilm y el medio de incubación en la concentración de glifosato en agua, fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de Medidas Repetidas, evaluando previamente los supuestos del modelo. En el primer experimento (efecto del tamaño de *L. fortunei*) los factores fueron comparados *a-priori* con contrastes ortogonales. En el segundo experimento (efecto valva-biofilm y medio de incubación) se realizaron comparaciones de a pares debido a la interacción significativa entre los factores analizados, respetando las suposiciones del modelo, para lo cual se debió transformar variables (con Logaritmo en base 10) para cumplir con el supuesto de esfericidad. Las comparaciones entre el peso seco del tejido blando de los mejillones y la tasa de excreción entre tratamientos, se llevaron a cabo mediante ANOVA de un factor, realizando comparaciones *a-priori* y *a-posteriori* según las hipótesis de cada caso (Zar 1996). Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el Software SPSS®.

Resultados

i) Respuesta evasiva de *L. fortunei* y ensayos de toxicidad

El comportamiento de los individuos de *Limnoperna fortunei* expuestos al glifosato no varió significativamente con la concentración de glifosato utilizada (10, 20 y 40 mg l⁻¹), y tampoco difirió del control (sin herbicida) (p=0,36). Para todas las concentraciones de glifosato los mejillones permanecieron con las valvas abiertas y sifones extendidos, desarrollando una filtración activa durante la mayor parte del tiempo. En el ensayo de toxicidad, solo se registró mortandad de 2 de los 120 mejillones utilizados: uno de ellos murió a una concentración de herbicida de 10 mg l⁻¹ al día 1, y el otro a 40 mg l⁻¹ de glifosato en el día 2. Asimismo, durante los dos experimentos de 21 días de duración llevados a cabo en la segunda etapa, no se registró ningún organismo muerto.

ii) Efecto de *L. fortunei* sobre la concentración de glifosato en agua

a) Impacto de la talla de *L. fortunei* sobre la disipación de glifosato en agua

La concentración inicial de glifosato en las unidades experimentales resultó ser 18,8 ± 0,3 mg l⁻¹. A lo largo del período experimental la concentración de glifosato se mantuvo casi invariable en el tratamiento control (C), con un decrecimiento promedio (± ES) de 3 ± 2 % (Fig. 16). En los tratamientos con mejillón, la concentración de glifosato se vio reducida a lo largo del experimento, en 11 ± 4 % (Lf P) y en 40 ± 2 % (Lf G), siendo la concentración de glifosato a tiempo final de 16,8 ± 0,7 mg l⁻¹ y de 11,4 ± 0,6 mg l⁻¹ respectivamente. En Lf P, el glifosato disuelto fue significativamente menor que la concentración inicial (p<0,05) al día 21. En Lf G, en cambio, la concentración de glifosato disminuyó con mayor rapidez, siendo significativamente menor respecto de la concentración inicial al día 2 del experimento (p<0,01). Al comparar la variación del glifosato entre tallas de mejillones, se observó que a partir del día 8 el glifosato disuelto en los tratamientos con Lf G fue significativamente menor que con Lf P (p<0,01). Ajustando los valores de concentración de glifosato vs. tiempo a una cinética de 1^{er} orden con función logarítmica, la ecuación obtenida es:

$\ln(\text{glifosato}) = -0,023 \cdot \text{tiempo} + \ln(18,343)$, ($R^2 = 0,95$ y $p < 0,05$). A partir de esta ecuación se obtuvo la tasa de disipación del glifosato (k) en tratamientos Lf G fue de $0,023 \text{ mg día}^{-1}$ ($\pm 0,002$), con una vida media de $30,6 \pm 4,5$ días. No se pudo estimar dicha tasa y la vida media del glifosato en los tratamientos Lf P y C debido a que la disminución del herbicida en agua fue muy baja, con una reducción máxima del 11% luego de tres semanas.

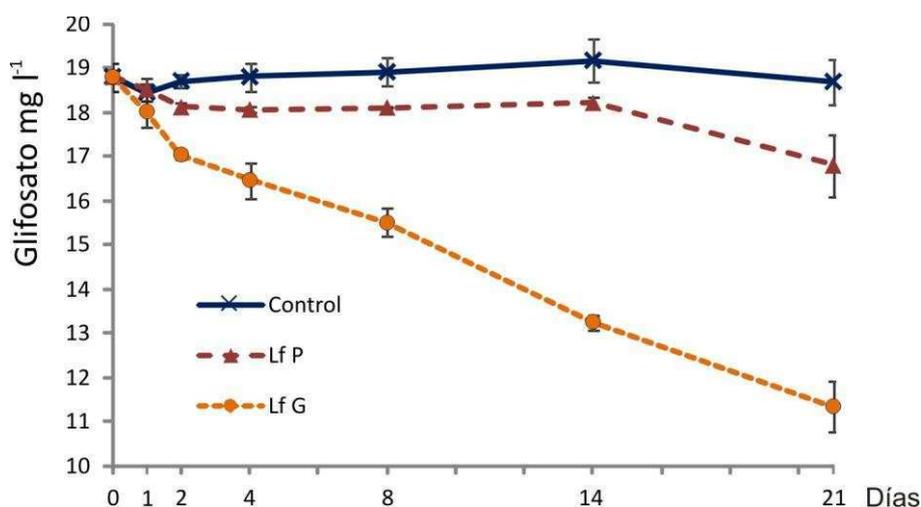


Figura 16: variación de la concentración de glifosato en agua (promedio \pm ES) a lo largo de la experiencia en los tratamientos control (Control, sin mejillón), con individuos de *Limnoperna fortunei* pequeños (Lf P) y grandes (Lf G).

Al calcular la cantidad de milimoles de glifosato disipados del agua por día en función del peso seco del tejido blando de los mejillones se observó que la mayor tasa se registró durante el 1er día con un promedio de 56,4 y 25,6 mmol de glifosato disipados por gramo de mejillón en Lf P y Lf G respectivamente. Si bien durante las primeras 24 hs la tasa de los mejillones pequeños duplicó aquella de los mejillones grandes, a partir del día 2 y en adelante, los mejillones grandes tuvieron mayor tasa de disipación del glifosato por unidad de peso seco, con un promedio general de 14,6 y 15,6 mmol de glifosato por día por peso seco mejillón para Lf P y Lf G respectivamente.

b) Relación de las valvas de *L. fortunei* y la calidad del agua sobre la disipación de glifosato en agua

(b.i) Concentración de glifosato en agua

Luego de la adición de glifosato a los distintos medios, la concentración obtenida fue de $16,0 \pm 0,2 \text{ mg l}^{-1}$ para agua declorada y de $15,5 \pm 0,3 \text{ mg l}^{-1}$ en agua de red. Se

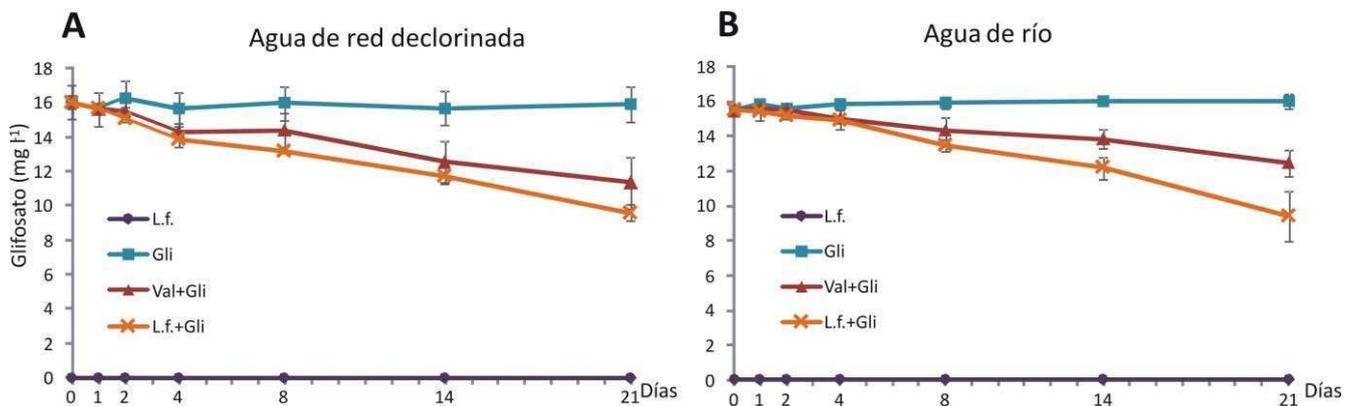
observó que la concentración de glifosato en agua disminuyó en presencia de mejillones (Lf + Gli) pero también en presencia de las valvas solas de *Limnoperna fortunei* (Val + Gli), tanto para el agua de red declorada como para el agua del Río de la Plata. Asimismo, en los acuarios que sólo contenían herbicida (tratamiento Gli) sin adición de mejillón ni de valvas, la concentración de glifosato en agua se mantuvo casi invariable durante los 21 días que duró el experimento (Fig. 17). En los tratamientos sin herbicida (tratamiento Lf) no se detectó glifosato durante todo el período experimental, indicando que no hubo contaminación en ninguna de las réplicas de dicho tratamiento para los dos tipos de agua.

En agua de red declorada, tanto en presencia de las valvas como de individuos completos vivos de *Limnoperna fortunei*, la concentración de glifosato disminuyó desde una concentración inicial de $16,0 \pm 0,2 \text{ mg l}^{-1}$ a una concentración final de $11,4 \pm 0,9 \text{ mg l}^{-1}$ y $9,6 \pm 0,3 \text{ mg l}^{-1}$ para Val+Gli y Lf+Gli respectivamente (Fig. 17 A). La concentración de glifosato en agua en estos tratamientos resultó significativamente menor que en el tratamiento Gli a partir de las 48 hs experimentales ($p < 0,01$ en ambos casos). En promedio, la presencia de *L. fortunei* vivos generó la disminución de la concentración de glifosato en agua de red de $50,2 \pm 3,4 \text{ g}$ por gramo de peso seco del tejido blando de mejillones por día.

En agua del Río de la Plata el glifosato disminuyó de una concentración inicial de $15,5 \pm 0,3 \text{ mg l}^{-1}$ a valores promedio de $12,5 \pm 0,5 \text{ mg l}^{-1}$ y de $9,5 \pm 0,8 \text{ mg l}^{-1}$ en los tratamientos Val+Gli y Lf+Gli respectivamente, siendo significativamente menor respecto al tratamiento control (Gli) a partir del día 8 ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ para Val+Gli y Lf+Gli respectivamente) (Fig. 17 B). Los mejillones vivos en agua de río generaron una disminución del glifosato de $33,9 \pm 1,1 \text{ g}$ por gramo de peso seco del tejido blando de mejillones por día. A pesar de que el decaimiento de la concentración del herbicida fue más lento en agua de río respecto al agua de red, no se detectaron diferencias significativas entre los medios de incubación para cada tratamiento. Esto indicaría que la variación en la concentración de glifosato está principalmente dada por la presencia del mejillón, ya sea como organismo vivo o sus valvas, y no por las características del agua utilizada. El efecto del mejillón sobre el herbicida estaría enmascarando posibles impactos que pudiera haber en la variación del glifosato en ambientes con distinta calidad de agua.

La concentración de glifosato disminuyó con mayor velocidad en presencia del individuo completo vivo en comparación con los tratamientos con valvas + biofilm, pero estos tratamientos solo difirieron significativamente en la concentración de glifosato a tiempo final (día 21) en agua de río ($p < 0,05$), la que fue significativamente menor en el tratamiento con mejillón vivo. En cuanto a la variación del glifosato a lo largo del tiempo, en Val+Gli hubo una disminución significativa de la concentración del herbicida entre el día 8 y el 14 en agua de red, y en cambio en agua de río esta disminución fue estadísticamente significativa recién entre los días 14 y 21 ($p < 0,01$ en los dos casos). En los tratamientos con mejillón y herbicida (Lf+Gli) la concentración de glifosato en agua disminuyó significativamente entre los días 8 y 14 para el agua de red, y con mayor velocidad, entre los días 4 y 8 para el agua de río ($p < 0,01$ en ambos casos).

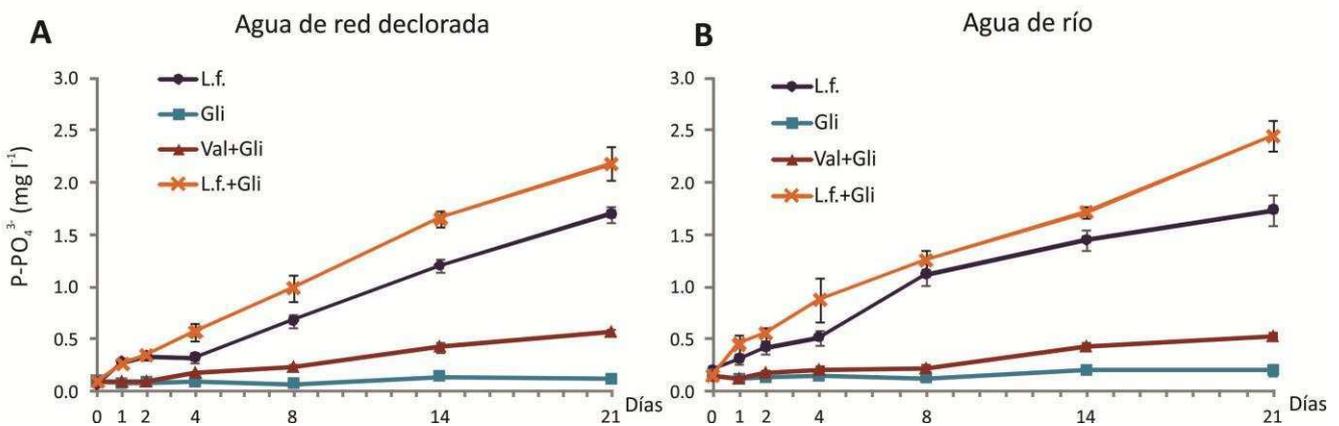
La vida media del glifosato resultó ser de $28,8 \pm 1,4$ días en acuarios con mejillón (Lf+Gli) en agua de red, y de $34,4 \pm 5,0$ en Lf+Gli con agua de río, con una tasa de disipación (k) de $0,024 \text{ mg día}^{-1}$ y de $0,021 \text{ mg día}^{-1}$ para agua de red y agua de río respectivamente. Por otro lado, en los tratamientos con valvas (Val+Gli) la vida media del glifosato resultó de $33,8 \pm 1,5$ día en agua de red, y de $68,8 \pm 4,8$ días en agua de río. A pesar de que la vida media fue mayor en agua de río, estas diferencias resultaron estadísticamente significativas solamente entre los tratamientos con valvas (Tukey: $p < 0,05$ entre Val+Gli de agua de red y agua de río).



Figuras 17 A y B: variación de la concentración de glifosato en agua (promedio \pm ES) a lo largo de la experiencia en los tratamientos con *Limnoperna fortunei* (Lf), con glifosato (Gli), con valvas de *L. fortunei* y glifosato (Val+Gli) y con individuos vivos de *L. fortunei* y glifosato (Lf+Gli), en acuarios con agua de red declorinada (A) y en acuarios con agua del Río de la Plata (B).

(b.ii) Fósforo reactivo soluble

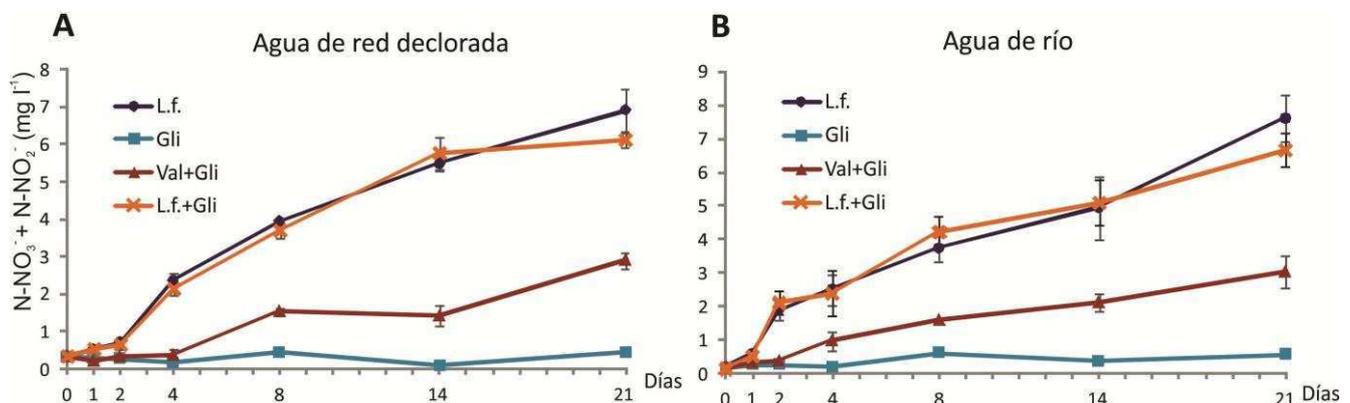
La concentración inicial de fósforo reactivo soluble (PRS) fue de $0,09 \pm 0,01 \text{ mg l}^{-1}$ en agua de red y de $0,15 \pm 0,03 \text{ mg l}^{-1}$ en agua de río (Fig. 18). En los tratamientos control con herbicida (Gli), no se observó variación en el PRS durante el período experimental. En acuarios con valvas en cambio (Val+Gli), se registró un aumento del PRS hasta valores de $0,57 \pm 0,03 \text{ mg l}^{-1}$ y de $0,53 \pm 0,02 \text{ mg l}^{-1}$ en agua de red y de río respectivamente. En presencia de mejillón completo (Lf y Lf+Gli) se observó un marcado aumento en la concentración de PRS en los dos tipos de agua, siendo mayor (pero no significativamente) este aumento en los acuarios con herbicida (Lf+Gli). A tiempo final el PRS cuantificado en acuarios con agua de red fue en promedio de $1,70 \pm 0,08 \text{ mg l}^{-1}$ y $2,18 \pm 0,16 \text{ mg l}^{-1}$ en los tratamientos Lf y Lf+Gli respectivamente. En agua de río el PRS a tiempo final alcanzó valores semejantes, con promedios de $1,73 \pm 0,15 \text{ mg l}^{-1}$ y $2,45 \pm 0,15 \text{ mg l}^{-1}$ en Lf y Lf+Gli respectivamente. Para ambos tipos de agua, los tratamientos Val+Gli y Lf+Gli difirieron significativamente en la concentración de PRS a partir del día 1 ($p < 0,01$ para los dos tipos de agua). El aumento en acuarios con mejillones completos vivos, tanto en los tratamientos sin glifosato (Lf) como los que tuvieron adición de herbicida (Lf+Gli) resultó ser significativo durante las primeras 24 hs para los dos tipos de agua ($p < 0,05$), mientras que en acuarios con valvas (Val+Gli) esto ocurrió de manera más gradual, siendo significativo este aumento a partir del día 4 en agua de red ($p < 0,05$) y a partir del día 14 en agua de río ($p < 0,01$).



Figuras 18 A y B: variación de la concentración de fósforo reactivo soluble ($P-PO_4^{3-}$) (promedio \pm ES) a lo largo de la experiencia en los tratamientos con *Limnoperna fortunei* (L.f.), con glifosato (Gli), con valvas de *L. fortunei* y glifosato (Val+Gli) y con individuos vivos de *L. fortunei* y glifosato (Lf+Gli), en acuarios con agua de red declarada (A) y en acuarios con agua del Río de la Plata (B).

(b.iii) Nitrógeno disuelto

El nitrógeno del nitrato + nitrito ($N\text{-NO}_3^- + N\text{-NO}_2^-$) cuantificado durante el experimento presentó un comportamiento semejante a lo observado para PRS (Fig. 19). En los acuarios con ausencia de mejillón y valvas (solo en presencia de glifosato, Gli) el $N\text{-NO}_3^- + N\text{-NO}_2^-$ fue bajo, con concentración inicial de $0,33 \pm 0,05 \text{ mg l}^{-1}$ y $0,14 \pm 0,01 \text{ mg l}^{-1}$ para agua de red y de río respectivamente, y no variaron significativamente durante todo el período experimental en ambos tipos de agua. Los tratamientos con valvas y glifosato (Val+Gli) presentaron un aumento gradual del $N\text{-NO}_3^- + N\text{-NO}_2^-$ en el tiempo, hasta valores promedio de $2,90 \pm 0,21 \text{ mg l}^{-1}$ y de $3,03 \pm 0,47 \text{ mg l}^{-1}$ en agua de red y de río respectivamente, diferenciándose del tratamiento Gli solo al día 21 ($p < 0,05$ en ambos tipos de agua). En los tratamientos con mejillón vivo, con y sin glifosato (Lf y Lf+Gli), el aumento en la concentración de $N\text{-NO}_3^- + N\text{-NO}_2^-$ fue más pronunciado, diferenciándose estadísticamente ($p < 0,05$) de los tratamientos con valvas (Val+Gli) a las 24 hs en agua de red y a las 48 hs en agua de río. A tiempo final se registraron las concentraciones máximas de $N\text{-NO}_3^- + N\text{-NO}_2^-$ con valores promedio de $6,90 \pm 0,55 \text{ mg l}^{-1}$ y de $7,60 \pm 0,69 \text{ mg l}^{-1}$ en los tratamientos Lf con agua de red y de río respectivamente. En los tratamientos con ambos factores Lf+Gli, la concentración final de nitrógeno $N\text{-NO}_3^- + N\text{-NO}_2^-$ fue levemente menor, con promedios de $6,10 \pm 0,20 \text{ mg l}^{-1}$ y $6,67 \pm 0,55 \text{ mg l}^{-1}$ en agua de red y de río respectivamente. A pesar de ser levemente mayor la concentración final en agua del Río de la Plata, no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos con mejillón (Lf y Lf+Gli) ni tampoco entre los tipos de agua.

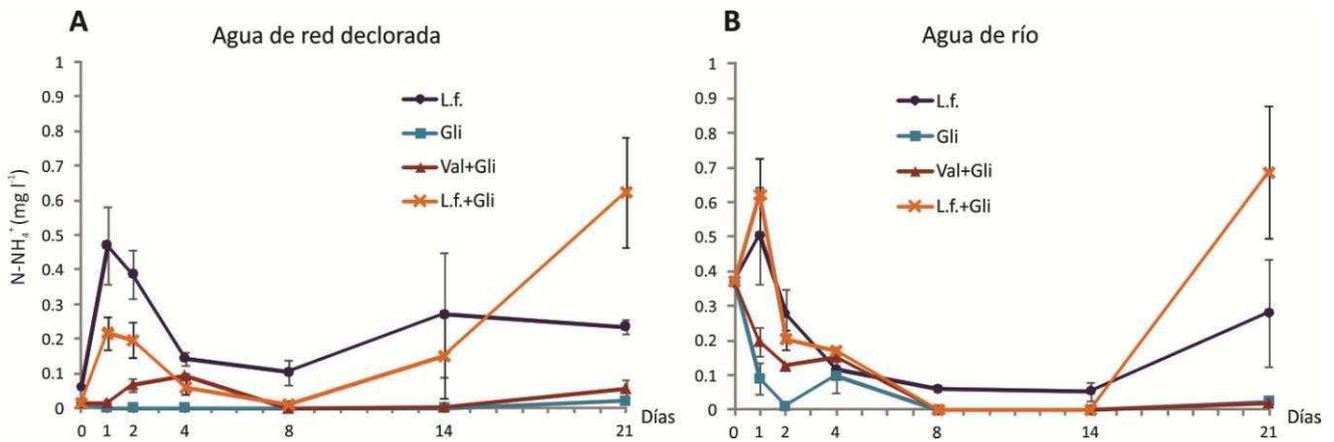


Figuras 19 A y B: variación de la concentración de nitrógeno de nitritos+nitratos ($N\text{-NO}_3^- + N\text{-NO}_2^-$) (promedio \pm ES) a lo largo de la experiencia en los tratamientos con *Limnoperna fortunei* (Lf), con glifosato (Gli), con valvas de *L. fortunei* y glifosato (Val+Gli) y con individuos vivos de *L. fortunei* y glifosato (Lf+Gli), en acuarios con agua de red declorada (A) y en acuarios con agua del Río de la Plata (B).

A diferencia de los demás nutrientes, el nitrógeno del amonio (N-NH_4^+) siguió un patrón de comportamiento distinto (Fig. 20), y este comportamiento varió con el tipo de agua utilizada. En agua de red, tanto el tratamiento Gli como el tratamiento Val+Gli presentaron bajos valores de N-NH_4^+ durante el experimento, con valores promedio entre $0,01$ y $0,09 \text{ mg l}^{-1}$. De todas maneras, en acuarios con valvas se pudo observar un pequeño aumento en la concentración del nitrógeno del amonio durante los primeros 4 días experimentales hasta un valor promedio de $0,09 \pm 0,01 \text{ mg l}^{-1}$, seguido de una súbita disminución de dicho nutriente. En presencia de mejillón (Lf y Lf+Gli), el N-NH_4^+ aumentó rápidamente durante las primeras 24 hs, para luego decrecer durante la primera semana. A partir del día 8 se observó nuevamente un aumento, más pronunciado en Lf+Gli que en Lf, alcanzando a tiempo final un promedio de $0,24 \pm 0,02 \text{ mg l}^{-1}$ y de $0,63 \pm 0,16 \text{ mg l}^{-1}$ en Lf y Lf+Gli respectivamente.

En los tratamientos con agua de río, los valores iniciales de N-NH_4^+ fueron mayores que aquellos medidos en agua de red, con un promedio de $0,37 \pm 0,01 \text{ mg l}^{-1}$. En Gli y Val+Gli, el nitrógeno del amonio decreció rápidamente durante la primera semana, y a partir del día 8 se encontró en muy bajas o nulas concentraciones. En presencia de *Limnoperna fortunei*, en cambio, el N-NH_4^+ aumentó rápidamente en las primeras 24 hs, posteriormente disminuyó durante la primera semana, y aumentó nuevamente durante la última semana experimental. La concentración final en acuarios con herbicida (Lf+Gli) duplicó la concentración final en tratamientos con solo mejillón (Lf), con concentraciones promedio al día 21 de $0,28 \pm 0,16 \text{ mg l}^{-1}$ y $0,69 \pm 0,19 \text{ mg l}^{-1}$ en Lf y Lf+Gli respectivamente.

En ambos tipos de agua la excreción de amonio ejercida por los mejillones fue mayor en presencia del herbicida, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos Lf y Lf+Gli para cada tipo de agua.



Figuras 20 A y B: variación de la concentración de nitrógeno de amonio ($N-NH_4^+$) (promedio \pm ES) a lo largo de la experiencia en los tratamientos con *Limnoperna fortunei* (Lf), con glifosato (Gli), con valvas de *L. fortunei* y glifosato (Val+Gli) y con individuos vivos de *L. fortunei* y glifosato (Lf+Gli), en acuarios con agua de red dechlorada (A) y en acuarios con agua del Río de la Plata (B).

(b.iv) Peso seco de mejillones

El peso seco del tejido blando de los mejillones utilizados en los tratamientos varió entre 18,4 y 28,2 mg por acuario, y no difirió significativamente entre acuarios. En los tratamientos con agua de red el promedio del peso seco del tejido blando del mejillón por acuario fue de: $22,3 \pm 0,1$ mg y $20,0 \pm 1,5$ mg para Lf y Lf+Gli respectivamente; y en agua de río de $20,0 \pm 1,3$ mg y $21,7 \pm 0,6$ mg para Lf y Lf+Gli respectivamente.

Discusión

i) Efecto del mejillón, de sus valvas y de la calidad del agua sobre el glifosato

El mejillón dorado *Limnoperna fortunei* no presentó un comportamiento de evasión (cerrando sus valvas) frente a la exposición a concentraciones de glifosato de hasta 40 mg l⁻¹. En todas las concentraciones del herbicida ensayadas los animales permanecieron con sus sifones extendidos y realizando un activa filtración a lo largo de la mayor parte del período experimental. Asimismo, durante 10 días de exposición no hubo una mortandad diferencial entre organismos expuestos a distintas concentraciones de glifosato, respecto a aquellos en agua limpia sin el xenobiótico. Si bien se ha encontrado que la exposición de organismos de *L. fortunei* durante tres semanas a concentraciones de hasta 6 mg l⁻¹ de glifosato (ácido, 95% puro) afecta marcadores bioquímicos del metabolismo del mejillón (Iummato *et al.* 2013), estos efectos no se manifestaron en el comportamiento y supervivencia en los ensayos de evasión y toxicidad. Dichos autores registraron un aumento en la actividad de la glutatión-S-transferasa y la fosfatasa alcalina, como también en los niveles de peroxidación lipídica en mejillones en tratamientos con glifosato. Asimismo, frente a concentraciones de glifosato, *L. fortunei* presentó una disminución significativa en la actividad de las carboxilesterasas y la superóxido dismutasa, indicando efectos adversos del herbicida en el metabolismo del mejillón (Iummato *et al.* op cit.).

Por otra parte, la concentración de glifosato en agua se vio afectada por la presencia de *Limnoperna fortunei*, observándose una reducción del 40 ± 2 % en el tratamiento con mejillones grandes (Lf G) en el primer experimento y del 40 ± 2 % y 39 ± 5 % en el segundo experimento en el tratamiento Lf+Gli, en agua de red y de río respectivamente (equivalente a una disminución de 51 ± 1 y 37 ± 2 mg de glifosato mejillón⁻¹ día⁻¹ en agua de red y de río respectivamente). Se comprobó que, en las concentraciones ensayadas, el efecto de *L. fortunei* de talla grande sobre el glifosato - que consiste en disminuir su concentración en agua aproximadamente un 40% luego de 3 semanas de exposición- es entonces repetible bajo las mismas condiciones experimentales. Asimismo, se observó que la disipación del glifosato en agua de río no

varió significativamente de aquella observada en agua de red, indicando que la calidad de agua no estaría afectando la respuesta de los mejillones al herbicida. Esto sugiere que *L. fortunei* actúa rápidamente en la disipación de glifosato en agua, enmascarando cualquier potencial efecto que pudieran tener las características fisicoquímicas (pH, conductividad, sólidos en suspensión, etc.) y biológicas (plancton) del agua sobre la concentración de glifosato. La disminución del glifosato observada en tratamientos con valvas vacías de *Limnoperna fortunei* nos indica que las valvas, junto con el biofilm asociado a ellas, estarían también participando en la disipación del glifosato en agua. La tasa de reducción media fue de 29 ± 5 % en agua de red, y de 20 ± 3 % en agua de río, lo que equivale a 40 ± 3 y 28 ± 3 mg de glifosato mejillón⁻¹ día⁻¹ en agua de red y de río respectivamente.

Por lo observado, la disipación del glifosato en agua expuesto a *Limnoperna fortunei* podría ser explicada a través tres mecanismos que no serían excluyentes entre sí: (1) adsorción del glifosato a la superficie de las valvas, del biofilm o tejido blando del mejillón; (2) degradación mediada por bacterias del biofilm de las valvas y/o por bacterias asociadas al metabolismo del mejillón vivo y (3) incorporación y metabolización del glifosato de forma directa por parte del mejillón. En cuanto a la adsorción a las valvas, se sabe que el glifosato tiene alta afinidad a iones metálicos (Barja y dos Santos Afonso 1998) y puede adsorberse a cationes en superficies sólidas mediante el grupo fosfato. La valva del mejillón está principalmente compuesta por dos fases, una interna (nácar) formada por carbonato de calcio cristalino en la forma de calcita o aragonita, y otra externa (periostraco) formada por una matriz de proteínas fibrosas (Taylor y Layman 1972). Asimismo, las valvas de los moluscos pueden contener cantidades traza de otros elementos como cationes metálicos dentro de las estructuras de aragonita y calcita, como también aniones de la propia valva atrapados como impurezas durante la calcificación o adsorbidos a material orgánico de la valva (Fritz *et al.* 1990). Es esperable por lo tanto que la adsorción del glifosato a las valvas ocurra principalmente en la cara interna de las mismas. Por otra parte, las valvas de los mejillones sostienen una cantidad de microorganismos en el biofilm adherido que podría estar participando en la degradación del glifosato. En los tratamientos con valvas se podría concluir que estaría ocurriendo un proceso de degradación del herbicida ya que se observó que a lo largo del tiempo no solo fue disminuyendo su

concentración, sino que además fue aumentando la aparición del fósforo reactivo soluble en agua, diferenciándose estadísticamente de la concentración a tiempo inicial. Como el enlace C-P presente en los compuestos fosfonatos es muy resistente a la hidrólisis química, a la descomposición térmica, a la fotólisis, como también a la acción de las enzimas fosfatasas (Hilderbrand 1983), consideramos que la ruptura de la molécula de glifosato tuvo que estar mediada por la acción de bacterias y hongos presentes en el biofilm de las valvas. Los fosfonatos se encuentran ampliamente distribuidos entre compuestos naturales en todos los reinos del mundo biológico, pero hasta el momento solamente organismos procariontes y algunos hongos son considerados capaces de romper el enlace C-P presente en los fosfonatos, y utilizar este compuesto como una fuente de fósforo (Castro *et al.* 2007; Kononova y Nesmeyanova 2002). La degradación del glifosato en tratamientos con valvas fue menos importante en agua del Río de la Plata respecto al agua de red, posiblemente debido a la presencia de predadores zooplanctónicos en agua de río que podrían estar modificando la estructura y el funcionamiento de la comunidad microscópica del biofilm de las valvas de *L. fortunei*. Adicionalmente, las propiedades físico-químicas del agua podrían alterar características biológicas de las células del biofilm facilitando su desprendimiento de las valvas y por lo tanto deteriorando su estructura (Moore *et al.* 2000). En el tercer caso, consideramos que si bien no se conocen trabajos en los que se evidencie la metabolización del glifosato por parte de mejillones, no tenemos evidencias suficientes para descartar dicha hipótesis. Por otro lado, podría darse la bioacumulación de glifosato en *L. fortunei*, considerando que los organismos bivalvos tienen la capacidad de concentrar en sus tejidos contaminantes ambientales orgánicos (Colombo *et al.* 1995, Doherty 1990), y que Wang *et al.* (1994) indicaron que habría acumulación de glifosato en tejido de peces (carpa y tilapia).

Se descarta un posible artefacto del experimento medidado por la adsorción de glifosato en las paredes de los acuarios ya que en tratamientos Gli (sin *L. fortunei*) el herbicida no varió significativamente durante el transcurso de los dos experimentos realizados a lo largo de 21 días.

ii) Vida media del glifosato

La disipación del glifosato en ambientes acuáticos naturales varía con las características químicas y biológicas del ambiente, como son el pH, la temperatura del agua, los sólidos en suspensión, la presencia de iones de hierro y aluminio o la actividad microbiana (Barja y dos Santos Afonso 1998 y 2005). En los ensayos se estimó una vida media de glifosato en agua en un rango entre 28-34 días en presencia de mejillón. Por otro lado, en los tratamientos con valvas (Val+Gli), la vida media del glifosato resultó ser 1,2 y 1,9 veces mayor que con mejillones vivos para agua de red y de río respectivamente. Si bien la vida media se encuentra dentro del rango estipulado según otros autores (entre 7 y 70 días), aquí resultó ser considerablemente mayor a aquella registrada en experimentos en mesocosmos, siendo menor a 8 días, (Pérez *et al.* 2007, Vera *et al.* 2010) y en microcosmos, de 16 días (Vera *et al.* 2012). En estos experimentos, tanto los microcosmos como los mesocosmos se encontraban al aire libre y con un medio acuático semejante al de las lagunas de la cuenca del río Salado (Pcia. de Buenos Aires) con características alcalinas. Nuestros ensayos fueron realizados en laboratorio en acuarios de 2 litros y en condiciones controladas de temperatura, lo que no facilitó la degradación del glifosato por parte de microorganismos o por fotólisis, como tampoco la adsorción del herbicida a sedimentos. Asimismo, el agua de río utilizada en nuestros ensayos proviene de un sitio del Río de la Plata con baja concentración de sales minerales y poca biomasa planctónica (de Cabo *et al.* 2003) que pudiera interactuar con el herbicida y participar en la disipación del glifosato (Barja y Dos Santos 1998, Gimsing y dos Santos Afonso 2005). La vida media del glifosato se ve afectada entonces no solo por la presencia de *Limnoperna fortunei*, tanto el organismo vivo como sus valvas con biofilm, sino también por las características ambientales del sistema en cuestión, tal como fuera reportado previamente (Goldsborough y Beck 1989).

iii) Nutrientes disueltos

Las concentraciones de fósforo reactivo soluble y de nitrato + nitrito en agua varió de manera similar, aumentando a lo largo del tiempo en los tratamientos con presencia de *Limnoperna fortunei* vivo, y en menor grado, en presencia del complejo

valva-biofilm. Los mejillones aportaron fosfatos y nitratos al ambiente debido probablemente a la actividad basal de su metabolismo, como fuera reportado previamente por Cataldo *et al.* (2012a y 2012b). Con adición de glifosato, el aumento del fosfato fue mayor, tanto en tratamientos con mejillón como con valvas-biofilm, probablemente dado por la degradación del herbicida realizada por los mecanismos detallados más arriba, que involucran a los microorganismos del biofilm de las valvas y al metabolismo del mejillón. A pesar de que se obtuvieron mayores valores de fosfato en los tratamientos con glifosato respecto a aquéllos sin herbicida, no se encontraron diferencias significativas entre ellos, indicando que si bien el glifosato es una fuente de fósforo, la liberación de fosfato al medio proveniente de la degradación del herbicida estaría siendo enmascarada por la tasa basal de excreción de los mejillones. Si el alimento se encuentra limitante (i.e. en tratamientos sin glifosato), los mejillones consumirán reservas propias para mantener una tasa metabólica basal. De acuerdo a nuestros resultados, en presencia de glifosato, la disponibilidad de alimento (i.e. el herbicida) no alcanzaría para generar grandes diferencias en la tasa de excreción debido a un aumento significativo de la tasa metabólica del mejillón.

Por otra parte, el aumento en la concentración de fósforo reactivo soluble y nitratos en agua en tratamientos con valvas en los dos tipos de agua utilizada, indicaría que sobre las valvas habrían microorganismos vivos excretando nutrientes inorgánicos al medio, apoyando la hipótesis de la degradación de glifosato por parte del biofilm. Al no encontrar diferencias significativas entre los tipos de agua se sugiere que la comunidad microbiana degradadora del herbicida estaría siendo aquella correspondiente al biofilm de la valva, en lugar de ser las comunidades planctónicas del agua. Asimismo, esto es confirmado por el tratamiento control con glifosato (Gli) en donde no se registró disipación del herbicida, ni aumento de nutrientes inorgánicos en el agua. La comunidad microbiana adherida a las valvas varía en su estructura y función de acuerdo a las condiciones ambientales donde fuera originada (Wimpenny 2000), y por lo tanto es posible que distintas comunidades microbianas difieran en su respuesta al glifosato. Por otro lado, es probable también que el biofilm sufra alguna alteración estructural y/o funcional al pasar del medio natural a un medio con distintas características físicas, químicas y biológicas, como el agua de red. El biofilm se encuentra condicionado tanto por las características del soporte en el que se

desarrolla como por las de la columna de agua en donde habita, integrando los efectos de las condiciones ambientales (Sabater *et al.* 2007).

El amonio presentó un comportamiento distinto a aquel observado para los demás nutrientes. La concentración inicial del nitrógeno del amonio fue mayor en agua de río respecto a aquella en agua de red. En presencia de *Limnoperna fortunei* el amonio aumentó durante las primeras 24 hs como resultado de la tasa de excreción de los mejillones, como fuera observado previamente por otros autores (Cataldo *et al.* 2012a y 2012b). Posteriormente la concentración disminuyó, especialmente en agua de río donde alcanzó valores casi nulos, posiblemente debido a la presencia de un mayor número de microorganismos en el agua que utilizan el amonio como fuente de energía. En la segunda o tercera semana (dependiendo del tipo de agua) la concentración de amonio volvió a aumentar en los tratamientos con presencia de *L. fortunei*, posiblemente debido a una mayor tasa metabólica de los mejillones una vez adaptados a las condiciones experimentales. No obstante, el aumento observado en los tratamientos con valvas para ambos tipos de agua, si bien no resultó ser estadísticamente distinto al amonio en el tratamiento control (Gli), sostiene nuevamente la hipótesis de la presencia de microorganismos vivos sobre el biofilm de las valvas.

iv) Peso seco de mejillones

No se encontraron diferencias en las variables de masa del tejido blando de los mejillones entre los tratamientos con glifosato de aquellos sin herbicida. Esto sugiere que de estar utilizando los mejillones al glifosato como alimento, la energía aportada por el herbicida no alcanzaría para superar los requerimientos energéticos del metabolismo basal de los organismos, o que el período experimental no fue lo suficientemente largo para detectar posible aumento de peso en aquellos mejillones expuestos al herbicida. De todas maneras se necesitaría otro tipo de ensayo para determinar si los mejillones están metabolizando el glifosato, y si este les provee de energía para obtener una ventaja metabólica frente a aquellos mejillones que no tuvieron adición de glifosato, por ejemplo utilizando glifosato marcado radioactivamente y evaluar su incorporación en el tejido de *L. fortunei*.

Conclusiones

En esta primera sección de la Tesis aportamos evidencias que indican que *Limnoperna fortunei* no sólo no ve alterado su comportamiento frente a la presencia de glifosato en agua en altas concentraciones (mucho mayores a aquellas reportadas en sistemas naturales), sino que favorece la mineralización del herbicida en agua tanto por su actividad filtradora como por la comunidad microbiana adherida a sus valvas, liberando nutrientes inorgánicos al medio. Si bien no se conocen trabajos que evalúen la capacidad degradadora de los mejillones sobre herbicidas en el agua, se sabe en cambio que dichos organismos generan grandes modificaciones en la disponibilidad de los nutrientes del sistema. En estudios previos se ha observado que tanto el mejillón *Limnoperna fortunei* como su par ecológico *Dreissena polymorpha*, remineralizan el amonio y el fosfato en los cuerpos de agua, modificando el ciclo de nitrógeno y de fósforo del sistema (Cataldo *et al.* 2012a y 2012 b, Conroy *et al.* 2005), aumentando los nutrientes disponibles para ser utilizados por los microorganismos. Estos resultados sugieren grandes efectos sobre el ambiente. Por un lado la rápida disipación del glifosato en agua ante la presencia de individuos de *L. fortunei* reduciría los efectos negativos del herbicida descriptos sobre organismos acuáticos no-blanco una vez que este compuesto alcanza cuerpos de agua después de una fumigación (Austin *et al.* 1991, Goldsborough y Brown 1988, Relyea 2005a y 2005b). Por otra parte, en aguas contaminadas con glifosato, la presencia del mejillón dorado aceleraría la disponibilidad de fósforo soluble para organismos autótrofos, facilitando y estimulando la eutrofización del sistema (Forlani *et al.* 2008, Vera *et al.* 2010).

Los resultados aquí presentados constituyen un primer paso hacia un potencial uso del mejillón dorado como agente biológico, capaz de moderar los efectos nocivos de las descargas de glifosato sobre la biota y los ambientes acuáticos. En ambientes con alta carga orgánica, se podrían ubicar jaulas con individuos de *L. fortunei* para facilitar y acelerar la mineralización del material orgánico particulado y en suspensión. Al tratarse de una especie invasora, con larva planctónica fácilmente dispersable, es de suma importancia utilizarlo solo en ambientes artificiales cerrados, o bien en sistemas naturales donde ya se encuentre el mejillón, para evitar facilitar su invasión a otros ecosistemas. Sin embargo, tal como fuera mencionado, en sistemas naturales la presencia conjunta de ambos agentes, estaría generando una aceleración en la

eutrofización del agua. El glifosato fue reportado como un agente que en el agua genera eutrofización (Vera *et al.* 2010 y 2012) y, en un escenario de interacción con *L. fortunei*, el fenómeno se vería agravado.

Para entender mejor las consecuencias ambientales de la interacción del *L. fortunei* con el herbicida glifosato se requieren estudios a mayor escala, que incluyan análisis del impacto sobre las variables físico-químicas y las comunidades biológicas del sistema. En la Sección II de la presente Tesis, incorporaremos evidencias sobre este punto.

En respuesta a las hipótesis planteadas para este capítulo, observamos que:

(1) *Limnoperna fortunei* no presentó una respuesta de evasión frente a concentraciones de glifosato de hasta 40 mg l⁻¹.

(2) El glifosato no afectó la mortalidad de los mejillones expuestos a concentraciones de glifosato de hasta 40 mg l⁻¹.

(3) La concentración de glifosato en agua disminuyó significativamente frente a la presencia del mejillón *Limnoperna fortunei*.

(4) La tasa de disipación del glifosato dependió de la talla de *Limnoperna fortunei*. Si bien los organismos más pequeños tienen una mayor tasa metabólica por unidad de peso, el efecto de los organismos de mayor tamaño sobre la concentración de glifosato en agua resultó significativamente mayor.

(5) El complejo valva-biofilm contribuyó al efecto del mejillón *Limnoperna fortunei* sobre la concentración de glifosato disuelto en agua, aportando no sólo una superficie de adsorción sino también degradación del herbicida por parte de las comunidades microbianas adheridas a las valvas.

(6) La disipación del glifosato mediada tanto por el individuo completo vivo de *Limnoperna fortunei* como por el complejo valva-biofilm fue independiente del tipo de agua utilizada.

Sección II

Interacción del glifosato y del mejillón

Limnoperna fortunei sobre

comunidades microbianas

y la calidad del agua dulce:

un estudio en microcosmos al aire libre

Introducción

Los trabajos que estudian la toxicidad de contaminantes como el glifosato, sobre organismos acuáticos, frecuentemente se llevan a cabo a través de bioensayos de laboratorio (Alberdi *et al.* 1996, Gardner *et al.* 1997, Goldsborough y Brown 1988, Schaffer y Sebetich 2004). Asimismo, gran parte de estos ensayos se realizan con cultivos monoespecíficos, y varios se basan en la concentración letal 50 (LC₅₀), es decir usan como indicador la concentración del tóxico en la que muere la mitad de los organismos bajo estudio. En general se utiliza este tipo de experimento para evaluar la toxicidad de las sustancias xenobióticas por parte de las organizaciones gubernamentales (e.g. EPA en USA, SENASA en Argentina) como así también en el proceso de patentamiento de los distintos formulados. Si bien los ensayos monoespecíficos constituyen una técnica ampliamente utilizada (e.g. Peterson y Hulting 2004, Solomon *et al.* 2007), no tienen en cuenta los efectos subletales (tanto agudos como crónicos) que pudiera provocar el contaminante sobre el metabolismo de los organismos. Asimismo, proveen de poco realismo al no incluir el análisis de la relevancia de la mortandad de una parte de la población sobre el funcionamiento de la comunidad como conjunto, ya que en un ambiente natural, distintas especies van a variar en su sensibilidad, tipo de respuesta y capacidad de recuperación frente a un biocida dado (Peterson *et al.* 1994). Diversos autores (Franz *et al.* 1997, Schmitt-Jansen *et al.* 2008) destacan la importancia de realizar estudios ecotoxicológicos a escala comunidad ya que tienen en cuenta las características propias de la comunidad (estructura y funcionamiento) que incluyen la interacción entre las poblaciones (competencia, predación, mutualismo, simbiosis, etc.) con las potenciales respuestas indirectas que pueden ocurrir. Asimismo, al incluir el medio abiótico, se pueden realizar evaluaciones de riesgo a escala ecosistémica considerando el efecto del contaminante sobre la interacción entre las variables bióticas y su medio físico-químico. Puede darse que a una escala (e.g. población, comunidad) se observe un tipo de respuesta frente a un contaminante dado, y que a una mayor escala (e.g. ecosistema) la respuesta sea diferente, inclusive opuesta. En estudios ecosistémicos la

alta complejidad implica muchas veces dificultades en la determinación de los efectos, ya que el análisis estadístico requiere de enfoques multivariados a menudo complejos. Sin embargo frecuentemente se pueden observar tendencias en el comportamiento de las variables ante un impacto, lo que resulta sumamente útil. Asimismo, las variaciones ambientales como pueden ser cambios en la temperatura, el fotoperíodo, la carga de nutrientes o el pH, generan modificaciones en la respuesta de la comunidad frente a un agente contaminante determinado (Chen *et al.* 2004, Pesce *et al.* 2009), como también modulan la evolución del contaminante en el sistema. Lo que consideramos una aproximación ideal es la evaluación mixta de los impactos, que incluye tanto estudios a escala monoespecífica como ecosistémica. Como indica Filser (2008) muchas veces existe una importante disociación entre los ecólogos y los toxicólogos, en donde los primeros no son conscientes de que el destino de los ecosistemas y sus servicios se encuentra altamente supeditado a decisiones de Agencias Gubernamentales las que mayoritariamente están basadas en estudios ecotoxicológicos estandarizados, mientras que los segundos no tienen en cuenta el futuro impacto que pudieran tener los estudios realizados en situaciones controladas de laboratorio, sobre los ambientes y sistemas naturales.

En los ecosistemas de agua dulce las comunidades microbianas autótrofas (algas y cianobacterias) son de suma importancia puesto que son los principales productores primarios y frecuentemente la base de las redes tróficas acuáticas (Vadeboncoeur y Steinman 2002, Wetzel 2001). Al analizar el efecto de los contaminantes en la microbiota, en general se espera que los organismos fotótrofos respondan más rápido a cambios en las concentraciones de nutrientes en el ambiente que los heterótrofos ya que directamente dependen de las formas químicas disueltas (Kelly *et al.* 1998). Por un lado, el fitoplancton resulta de gran importancia al momento de evaluar la respuesta de la microbiota a un agente de estrés ya que responde rápidamente a cambios ambientales y posee ciclos de vida cortos, facilitando su análisis (Vera 2011). Asimismo el perifiton -la comunidad microbiana que vive adherida a un sustrato sumergido natural o artificial- es utilizado ampliamente como herramienta biológica en estudios de evaluación de calidad del agua (Pizarro y Alemani 2005). El perifiton se encuentra compuesto por bacterias, hongos, algas, protozoos, animales, detritos orgánico e inorgánico inmerso en una matriz mucilaginoso (Wetzel 1983), y por el hecho de estar

fijo en un sustrato, integra temporalmente los efectos de las condiciones ambientales del sitio en donde se desarrolla. Es un excelente sistema para utilizar como biomonitor del ambiente debido a que es una comunidad sésil, con poblaciones de alta tasa de reproducción y pequeño tamaño, gran riqueza en especies y con diversidad fisiológica de los organismos que lo componen (Sabater *et al.* 2007). Dentro del perifiton, las algas (llamaremos algas tanto a las eucariotas como a las cianobacterias) son los organismos más apropiados para entender el impacto de contaminantes en el ambiente, puesto que son las primeras en interactuar con las sustancias disueltas (i.e. nutrientes, materia orgánica, xenobióticos) (Lowe y Pan 1996, Sabater *et al.* 2007). En adición, al incluir en los estudios a un conjunto mayor de otras comunidades microbianas heterótrofas (e.g. bacterioplancton, zooplancton y fracción heterótrofa del perifiton) se puede evaluar a una escala aún más realista el impacto de un contaminante sobre el ecosistema, al considerar la interacción de los diferentes compartimentos ecológicos. Los trabajos que estudian el impacto del glifosato o sus formulados sobre la fracción microscópica acuática se han desarrollado en su mayoría sobre cultivos monoalgales (Maule y Wright 1984, Pesce *et al.* 2009, Peterson *et al.* 1994, Romero *et al.* 2011), sin embargo también existen estudios a escala comunidad (Austin *et al.* 1991, Goldsborough y Brown 1988, Relyea 2005a, Schaffer y Sebetich 2004, Tsui y Chu 2003) y unos pocos a escala ecosistémica (Pérez *et al.* 2007, Vera *et al.* 2010 y 2012).

A pesar de ser considerablemente menor el número de trabajos que estudian el efecto de los herbicidas sobre el bacterioplancton, las bacterias tienen un rol clave en el metabolismo del ecosistema acuático puesto que son los principales descomponedores y por lo tanto facilitan el reciclado de los nutrientes del sistema. Asimismo, por ser el glifosato una molécula biodegradable por actividad de algunos tipos de bacterias (Kononova y Nesmeyanova 2002, Quinn *et al.* 2007), esta comunidad resulta de suma importancia en el estudio de la evolución del herbicida en los cuerpos de agua dulce. Además, las bacterias pueden contribuir a la producción del sistema a través del consumo de carbono orgánico disuelto, interviniendo en lo que se conoce como el “bucle microbiano” (Azam *et al.* 1983). Pesce (*et al.* 2008) encontraron cambios en la estructura de las comunidades bacterianas de ríos con aportes de glifosato. Se han registrado cambios significativos en la composición de las

comunidades bacterianas de sedimentos de un lago expuesto a concentraciones ambientalmente relevantes de glifosato ($150 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso seco de sedimento) (Widenfalk *et al.* 2008), a pesar de que la actividad de toda la comunidad, medida a través de la incorporación de ^3H -leucina, no se modificó.

Por otra parte, si bien son pocos, existen algunos trabajos que evalúan el efecto de herbicidas sobre el zooplancton de agua dulce. Se ha demostrado que larvas nauplii del copépodo *Cyclops vernalis* son afectados frente a la exposición de herbicidas (Robertson y Bunting 1976). El zooplancton es una comunidad sensible al estrés ambiental y el estudio de tablas de vida de poblaciones de microinvertebrados puede ser muy útil a la hora de evaluar el efecto de contaminantes en un ecosistema de agua dulce (Schindler 1987), siendo los estadios larvales los más vulnerables a los efectos tóxicos de contaminantes. Se ha informado que un formulado a base de glifosato (Vision®) a concentraciones menores de $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ de ingrediente activo, altera significativamente la supervivencia del cladóceros *Simocephalus vetulus*, indicando que la toxicidad del formulado se ve incrementada a valores mayores de pH (7,5 respecto de 5,5) (Chen *et al.* 2004). Vera *et al.* (2012) encontraron que en microcosmos con agregado del formulado Glifosato Atanor® (a $3,5 \text{ mg l}^{-1}$ de ingrediente activo), se vio favorecido el crecimiento de los rotíferos *Lecane* spp luego de 21 día de exposición. Los autores suponen que este aumento se debió a un efecto indirecto del herbicida en el sistema, ya que el formulado de glifosato estimuló el desarrollo de bacterias planctónicas que son alimento de estos rotíferos, razón por la cual se detectó el aumento en densidad. Asimismo, dichos autores registraron una disminución en la abundancia de los adultos calanoideos, que lo atribuyeron a un efecto directo de toxicidad sobre sus larvas y por lo tanto una disminución en la abundancia de los siguientes estadios.

El estudio de agentes contaminantes como el glifosato, utilizado directamente en ambientes naturales, se dificulta por cuestiones éticas y logísticas. Si bien se pueden encontrar trabajos que lo realizan (e.g. Tsui y Chu 2008), la aplicación intencional de biocidas a un ambiente natural supone asumir el riesgo de alterar el funcionamiento del ecosistema sin asegurar su recuperación puesto que, una vez finalizada la experiencia, las consecuencias sobre el ambiente seguirán operando y a menudo son

desconocidas. Asimismo, si bien provee de un enfoque más realista, los estudios sobre sistemas naturales no permiten extrapolar a otros tipos de ambientes ya que es probable que las características particulares de cada ecosistema modelen la respuesta frente a xenobióticos. En particular el aporte de glifosato en cuerpos de agua dulce naturales puede provocar a largo plazo un aumento en el nivel trófico y la turbidez del sistema (Austin *et al.* 1991), pudiendo generar un cambio irreversible de un estado de aguas claras a uno de aguas turbias (Vera *et al.* 2011). Asimismo, muchas veces el aporte de nutrientes conlleva la eutrofización, el crecimiento desmedido de cianobacterias tóxicas (e.g. *Microcystis aeruginosa*) y un deterioro en la calidad del agua (Forlani *et al.* 2008, Vera *et al.* 2010). No obstante, se pueden realizar estudios sobre ambientes naturales que ya se encuentren afectados por el contaminante de interés, producto de la actividad antrópica en los alrededores, como la agricultura. Por ejemplo, Pesce *et al.* (2008) estudiaron durante 11 meses los cambios en las poblaciones planctónicas de un río que recibía aportes de pesticidas de campos aledaños, donde pudieron medir el metabolito principal del glifosato (el ácido aminometilfosfónico, AMPA), encontrando efectos adversos en las comunidades algales y cambios en la composición bacteriana.

La importancia de realizar estudios en microcosmos al aire libre radica en la posibilidad de evaluar a nivel ecosistémico respuestas complejas de manera estandarizada y repetible, seleccionando los agentes de estrés ambiental de interés (Schmitt-Jansen *et al.* 2008). La complejidad que afrontan estudios a escala ecosistémica en micocosmos supone una alta heterogeneidad entre réplicas y en el comportamiento de las variables analizadas. Si adicionalmente los experimentos en microcosmos se realizan a la intemperie, se acentúa la variabilidad e impredecibilidad de la respuesta del sistema puesto que se someten las unidades experimentales a los cambios en las condiciones ambientales, aunque al mismo tiempo permiten un mayor realismo y extrapolación sobre los sistemas naturales.

En nuestro país, se han realizado experimentos controlados en mesocosmos y microcosmos a la intemperie para estudiar el efecto de formulados de glifosato en las comunidades microbianas en interacción con el medio abiótico (Pérez *et al.* 2007, Vera *et al.* 2010 y 2012). Como resultado de dichos estudios, Pérez *et al.* (2007) registraron

un cambio en la estructura de las comunidades de fitoplancton y perifiton expuestas a una única dosis de Roundup® a concentraciones de 6 y 12 mg l⁻¹ de principio activo (glifosato), con una disminución en la abundancia del micro y nanofitoplancton, y un aumento de 40 y 4,5 veces de las picocianobacterias del fitoplancton y perifiton respectivamente respecto a los controles. Asimismo, la producción primaria casi se duplicó en los mesocosmos tratados con Roundup®. Por su lado, Vera *et al.* (2010) en mesocosmos tratados con Roundup® a 8 mg l⁻¹ glifosato (una única dosis al comienzo del experimento) también observaron un aumento en la abundancia de las cianobacterias del perifiton. Asimismo, la colonización de sustratos artificiales por parte del perifiton se vio retrasada en mesocosmos con glifosato, lo que implica el retraso de la expansión de esta comunidad en escenarios con herbicida. En experimentos posteriores, Vera *et al.* (2012) en microcosmos a la intemperie con el formulado Glifosato Atanor® a concentración de 3,5 mg l⁻¹ de glifosato, registraron un aumento de las picoacianobacterias planctónicas y de algas filamentosas del perifiton en presencia del herbicida. Los coadyuvantes y compuestos aditivos que forman parte de los formulados comerciales a base de glifosato utilizados en los experimento descritos, como así también las concentraciones de herbicida, pueden afectar y modular la respuesta del ecosistema. El problema se observa complejo ya que los formulados presentan distintas composiciones químicas y, como primer paso, resulta necesario evaluar el impacto del glifosato puro sobre las comunidades microbianas. De esta manera, se analiza el efecto del principio activo, considerando la posibilidad de que a diferentes concentraciones la respuesta varíe.

Las especies exóticas filtradoras que logran proliferar rápidamente en un ambiente volviéndose invasoras, generan grandes impactos sobre los ecosistemas que colonizan. Como fuera detallado en la Introducción General, las altas tasas de filtración del mejillón dorado *Limnoperna fortunei*, que pueden alcanzar valores de hasta 350 ml hora⁻¹ individuo⁻¹ (Sylvester *et al.* 2005), no sólo afectan condiciones abióticas del sistema (Strayer 2010), sino que también afectan de manera directa a las comunidades microbianas de la columna de agua (Cataldo *et al.* 2012b, Frau *et al.* 2012, Rojas Molina *et al.* 2010), y de manera indirecta, al perifiton (Cataldo *et al.* 2012a). Por un lado, la alta tasa de filtración aumenta la transparencia del agua, permitiendo que la

luz incidente alcance profundidades mayores, beneficiando a especies autótrofas del bentos (Boltovskoy *et al.* 2009a). Asimismo, la metabolización por acción del bivalvo de materia orgánica disuelta y suspendida en la columna de agua va a acelerar los ciclos de mineralización de nitrógeno y de fósforo del sistema, retirando gran parte del nitrógeno y fósforo particulado de la columna de agua y aportando fosfatos y amonio, aumentando los nutrientes biodisponibles para los microorganismos (Cataldo *et al.* 2012b, Conroy *et al.* 2005, Karatayev *et al.* 2003). Además, la generación de heces y pseudoheces por parte de los mejillones, resulta en el aumento de la tasa de sedimentación de partículas en suspensión y aumento de los nutrientes en el bentos (Cataldo *et al.* 2012a). Por otra parte, el consumo de algas por parte de *L. fortunei* es selectivo, y si bien puede preda sobre organismos de tamaños hasta 1100 μm (Rojas Molina *et al.* 2011), posee preferencia por individuos pequeños, menores a 100 μm (Cataldo *et al.* 2012b, Frau *et al.* 2012, Rojas Molina *et al.* 2010, Sylvester *et al.* 2005), y por lo tanto va a afectar diferencialmente a las distintas poblaciones planctónicas, generando modificaciones en la abundancia y la estructura de la comunidad del fitoplancton (Cataldo *et al.* 2012a, Cataldo *et al.* 2012b, Miller y Watzin 2007, Naddafi 2007, Strayer 2010). Se ha observado en diversos trabajos que en presencia de organismos filtradores como *L. fortunei* o del molusco cebra *Dreissena polymorpha* que comparte características ecológicas con el mejillón dorado (Karatayev *et al.* 2007, Sylvester *et al.* 2005), se ve favorecido el crecimiento de especies de cianobacterias fitoplanctónicas del género *Microcystis* (Bykova *et al.* 2006, Cataldo *et al.* 2012a, Fishman *et al.* 2009, Lavrentyev *et al.* 1995, Qiu *et al.* 2013). Generalmente el mejillón dorado *L. fortunei* se alimenta tanto de algas verdes como de cianobacterias, pero cuando estas últimas tienen toxinas, su consumo se ve significativamente reducido (Boltovskoy *et al.* 2009b, Juhel *et al.* 2006). Se pudo observar en ensayos con *D. polymorpha* una selección negativa de colonias de *Microcystis* sp. que eran selectivamente eliminadas a través de las pseudoheces excretadas (Vanderploeg *et al.* 2001). Cataldo *et al.* (2012a) reportaron que el impacto negativo de la predación de *L. fortunei* sobre el fitoplancton presenta una mayor relevancia que el efecto positivo sobre la disponibilidad de nutrientes. Por otro lado, la comunidad del perifiton se vería beneficiada por el impacto del mejillón ya que recibe mayor aporte de nutrientes producto de la acción del molusco, sin sufrir de su predación, al encontrarse adherida a

un sustrato y fuera del alcance del mejillón (Cataldo *et al.* 2012a, Lowe y Pillsbury 1995).

Como se ha comentado en la Introducción General de esta tesis, los agentes contaminantes no operan de manera aislada en el ambiente sino que interactúan con otros factores de cambio. La interacción de dos o más factores de cambio en el ambiente puede generar efectos diferentes y novedosos sobre un ecosistema que los que se observan con cada factor por separado (Townsend *et al.* 2008). En los cuerpos de agua someros de la región pampeana argentina que reciben una importante carga de herbicidas debido tanto al cultivo intensivo de la soja transgénica como a la práctica del barbecho químico, pueden también encontrarse ejemplares de *Limnoperna fortunei*, especie invasora con amplia distribución en gran parte de la cuenca del Paraná-Río de la Plata. En dichos ambientes, la acción conjunta del glifosato y del mejillón dorado estarían afectando las condiciones bióticas y abióticas del sistema. A partir de los resultados obtenidos en la Sección I de esta Tesis, comprobamos que a dosis ambientalmente relevantes y comunes de glifosato, la actividad del mejillón dorado no se ve alterada, sino por el contrario, dicho organismo participa acelerando la disipación del herbicida en la columna de agua, aportando nutrientes como producto de su degradación. La reducción del herbicida y el aporte de fosfato suponen un efecto directo sobre las comunidades autótrofas del sistema que se verán favorecidas, aumentando su desarrollo. Para comprobar esta hipótesis y entender de manera más holística el posible impacto sobre las comunidades de un sistema de agua dulce, nos propusimos realizar estudios a nivel ecosistémico que incluyeran a las principales comunidades microbianas autótrofas y heterótrofas en interacción con el medio abiótico.

Objetivo

El **objetivo general** de la presente Sección consiste en realizar un estudio factorial durante 25 días en microcosmos a la intemperie que simulan cuerpos de agua lénticos someros para evaluar el efecto de la interacción de dos agentes antropogénicos de impacto en el ambiente, el mejillón dorado *Limnoperna fortunei* y el herbicida glifosato, sobre las comunidades microbianas de agua dulce y la calidad general del agua. Para llevarlo a cabo se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- (1) Evaluar degradación mediante la medición de la concentración de glifosato disuelto luego de una única inoculación en el agua, en escenarios con presencia y con ausencia de individuos de *L. fortunei*.
- (2) Estudiar el impacto de cada agente por separado como así también por la interacción de estos, sobre las comunidades microbianas mediante el análisis cuali y cuantitativo del zooplancton, fitoplancton, perifiton y bacterioplancton.
- (3) Analizar los ítems anteriores para distintas concentraciones de glifosato, ambientalmente relevantes (1, 3 y 6 mg l⁻¹), aplicados en una única inoculación al comienzo del experimento, para estudiar el posible efecto relacionado con la concentración del herbicida.
- (4) Evaluar el efecto sobre la calidad del agua por parte de cada agente por separado, como también por su interacción a diferentes concentraciones del herbicida, mediante el análisis de las principales variables físicas y químicas del agua como también sobre la clorofila-*a* del fitoplancton.

Hipótesis

Las hipótesis planteadas para los objetivos específicos propuestos son:

- (1) La vida media del glifosato en cuerpos de agua someros, artificiales, al aire libre y con una comunidad microbiana bien desarrollada es menor en presencia de *Limnoperna fortunei* que en su ausencia.

- (2) La interacción de *L. fortunei* y del glifosato genera modificaciones en las comunidades microbianas diferentes a las que se observan con cada agente por separado.
- (3) El efecto en la interacción de *L. fortunei* y del glifosato sobre las comunidades microbianas y la calidad del agua dulce depende de la concentración de herbicida utilizada.
- (4) La interacción de *Limnoperna fortunei* y el glifosato tiene un efecto diferente en la calidad del agua del que es observado por efecto de cada agente por separado.
- (5) No hay diferencia a lo largo del tiempo en el impacto de cada agente por separado como por la interacción sobre las variables analizadas.

Metodología

El ensayo se llevó a cabo en microcosmos ubicados en tanques de acuicultura experimentales dispuestos a la intemperie, localizados en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), dentro del predio de la Ciudad Universitaria, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

i) Tanques experimentales

Los tanques de acuicultura, en número de tres, con capacidad de 3000 litros, 1 m de altura y 2 m de diámetro, se instalaron dentro de un área de 40 m² que fue debidamente cercada para su aislamiento (Fig. 21 A). Una vez emplazados, fueron llenados con agua de red (Fig. 21 B) y se los dejó reposar durante 48 hs con suministro continuo de aire mediante aireadores eléctricos, para facilitar y acelerar la disipación de cloro hacia la atmósfera. Con el objetivo de incorporar a los tanques propágulos de las principales comunidades microbianas de estanques de ambientes naturales, se le agregaron plantas acuáticas (del tipo *Elodea* sp.) obtenidas del Lago del Golf y del Lago Regatas -dos estanques artificiales del parque 3 de Febrero, Palermo (CABA)-. Un mes más tarde se realizaron otras tres inoculaciones de agua concentrada obtenida de los mismos estanques, para acelerar la proliferación de comunidades microbianas de agua dulce en la columna de agua (bacterio, fito y zooplancton), como también la colonización de especies adheridas a sustratos (perifiton). Estas inoculaciones se realizaron durante la primavera del año 2009, y se dejaron evolucionar los cuerpos de agua artificiales durante 5 meses, con el fin de obtener condiciones comparables a ambientes lénticos naturales. Durante dicho período, se evaluaron sucesivamente distintas variables fisicoquímicas y biológicas del agua de cada tanque (temperatura, pH, conductividad, turbidez, oxígeno disuelto y concentración de clorofila-*a* fitoplanctónica) para monitorear la evolución biótica y abiótica de estos sistemas (Fig. 21 C). En algunas fechas pre-experimentales, se mezcló el agua de los tres tanques mediante un sistema formado por bombas de achique y mangueras plásticas, para lograr homogeneización entre los cuerpos de agua, con la intención de obtener

unidades experimentales idénticas. Durante este tiempo, los dispositivos fueron tapados con tul blanco, sin afectar significativamente la luz incidente en el agua, para prevenir la proliferación de insectos en los cuerpos de agua (e.g. *Aedes aegypti*).

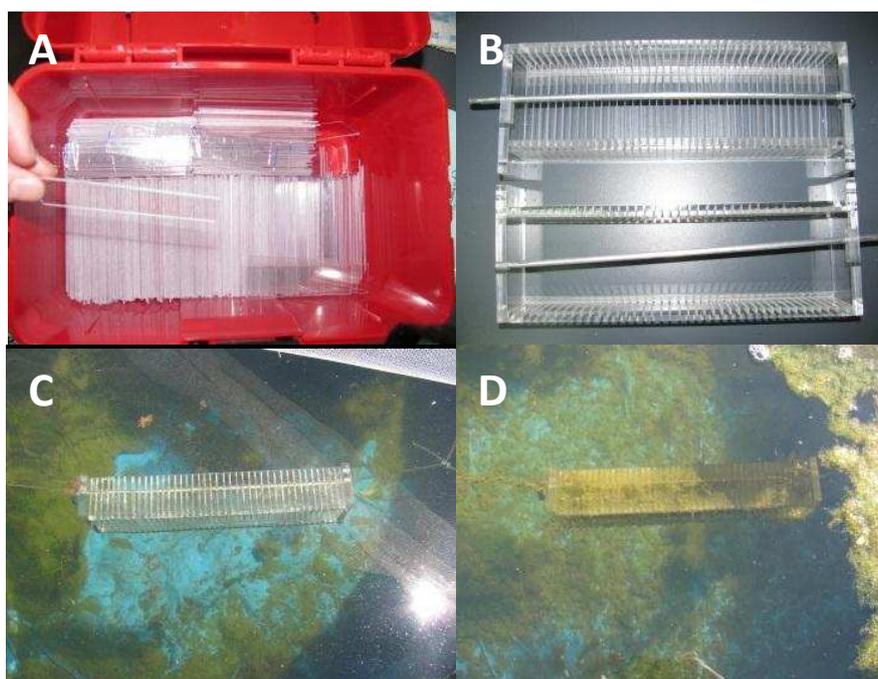


Figuras 21 A, B y C: (A) instalación de los tanques en el Campo Experimental; (B) llenado con agua de red; y (C) monitoreo de variables fisicoquímicas con sensor multiparamétrico de campo.

Con el objeto de abastecer eléctricamente a los aireadores y a las bombas de achique, se instaló una casilla cercana a los tanques, para resguardar de la lluvia una llave térmica, un disyuntor, y 6 tomas de electricidad.

ii) Colonización de sustratos artificiales por perifiton

Una vez que la concentración de clorofila-*a* fitoplanctónica alcanzó niveles característicos de cuerpos de agua eutróficos (superiores a $10 \mu\text{g l}^{-1}$) (Wetzel 2001), se colocaron en cada tanque dispositivos artificiales contruidos *ad hoc* para sujetar sustratos a ser colonizados por comunidades perifíticas, que llamaremos “perifitómetros” (Fig. 22 A y 22 B). Los *perifitómetros*, consisten de una estructura de acrílico que contiene 40 sustratos de policarbonato transparente de $29,1 \text{ cm}^2$ de área total (i.e. considerando las dos caras) cada uno. Se colocaron ocho *perifitómetros* suspendidos dentro de cada tanque, sumergidos a 10 cm de la superficie (Fig. 22 C). Se dejaron colonizar y evolucionar las comunidades adheridas a los sustratos durante un mes, considerado como un período suficiente en época estival para alcanzar comunidades maduras de perifiton (Fig. 22 D). Finalizado este período, a fines de febrero de 2010 se comenzó con el experimento.



Figuras 22 A, B, C y D: (A) sustratos de policarbonato transparente; (B) soportes de acrílico “perifitómetros” vacío (arriba) y con sustratos (abajo); (C) perifitómetro con sustratos sumergido en un tanque; (D) perifitómetro con sustratos colonizados por especies perifíticas de agua dulce.

iii) Microcosmos

El experimento se realizó utilizando microcosmos, que fueron instalados dentro de cada tanque. Los microcosmos consistieron en bolsas de aproximadamente 75 litros (44 cm de diámetro y 50 cm de profundidad) de polietileno transparente de 100 micrones de espesor, con doble capa para evitar filtraciones de agua, que fueron sostenidas por dispositivos de policarbonato contruidos *ad hoc*. En cada tanque se dispusieron 8 bolsas que fueron llenadas con agua del mismo, y posteriormente se le colocó a cada microcosmos un *perifitómetro* con sustratos previamente colonizados del propio tanque suspendido a 10 cm de la superficie (Fig. 23 A y 23 B). Todos los microcosmos fueron suministrados con aire continuo durante el período experimental. En consecuencia, cada microcosmos con agua del respectivo tanque y un *perifitómetro* constituyó una unidad experimental. Durante la experiencia todos los microcosmos estuvieron abastecidos de oxígeno con aireación continua.



Figuras 23 A y B: (A) vista de los tres tanques con los microcosmos instalados y detalle de un tanque; (B) los ocho microcosmos cada uno provisto de un perifitómetro y aireación constante.

Los tanques fueron tapados con nylon ante la amenaza de una lluvia fuerte para evitar que rebalsaran los microcosmos y que se pusiera en riesgo el experimento. En caso de lloviznas o lluvias de poca intensidad los tanques no fueron tapados de manera tal de favorecer el realismo del experimento. Sin embargo, se registró una intensa lluvia durante la noche del día 20 en la que cayeron 22 mm de agua (Servicio Meteorológico Nacional) en que los tanques no fueron tapados, no rebalsaron ni se mezclaron los microcosmos aunque resultó en una dilución de aproximadamente un 6,5 % de los cuerpos artificiales.

iv) Diseño experimental

Se definieron ocho tratamientos por tanque que fueron asignados al azar a cada microcosmos, obteniéndose así tres réplicas por tratamiento (una réplica por tanque). Se analizaron dos factores: glifosato y mejillón. El factor glifosato contó con 4 niveles: 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹; mientras que para el factor mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) tuvo dos niveles: presencia y ausencia. Las muestras fueron tomadas en 5 fechas: a los 0, 1, 7, 14 y 25 días de la inoculación del herbicida. A continuación se presenta una tabla con la codificación propuesta para identificar cada tratamiento (Tabla 3), y un esquema de cómo quedó la distribución luego de la asignación al azar de los tratamientos dentro de los tres tanques (Fig. 24).

		Glifosato inicial (mg l ⁻¹)			
		0	1	3	6
<i>Limnoperna fortunei</i>	Sin	0-Lf	1-Lf	3-Lf	6-Lf
	Con	0+Lf	1+Lf	3+Lf	6+Lf

Tabla 3: codificación que utilizaremos para identificar cada uno de los ocho tratamientos que se realizaron en cada tanque.

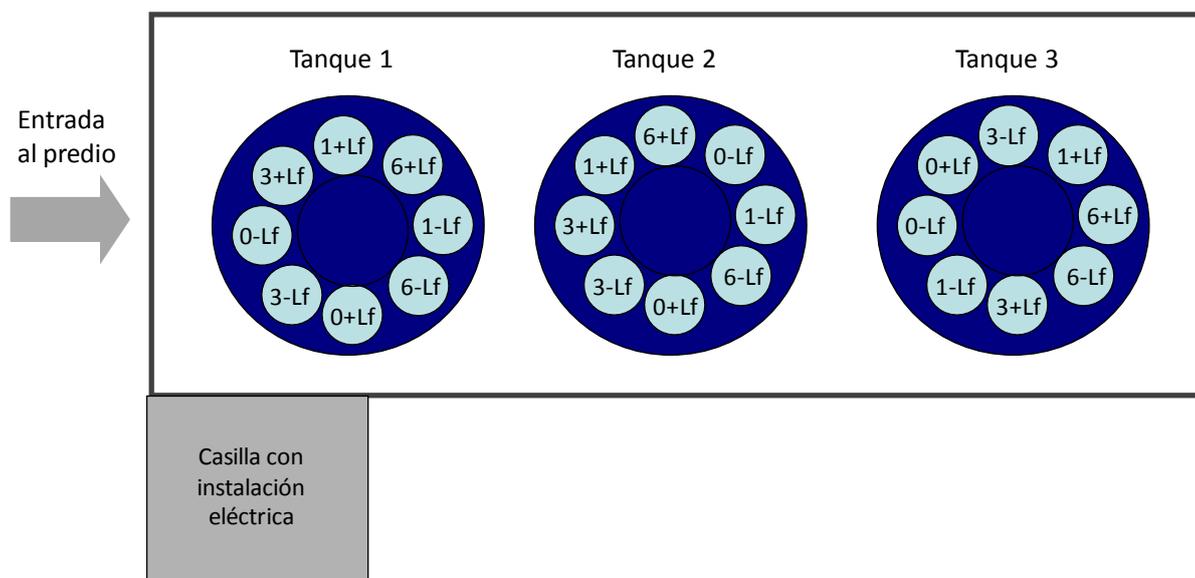


Figura 24: disposición de los tres tanques de acuicultura dentro del predio y distribución de los ocho tratamientos dentro de cada tanque en los microcosmos (bolsas de 75 litros). Los tratamientos consistieron en dosis de glifosato (0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹) con ausencia y presencia de *Limnoperna fortunei* (-Lf y +Lf respectivamente).

Para los tratamientos con agregado de herbicida, se preparó una solución madre concentrada de **glifosato**, diluyendo su forma ácida en grado técnico (aproximadamente 95% puro) en agua bidestilada, con la ayuda de un agitador magnético. Luego se agregó el volumen necesario de solución madre de glifosato a cada microcosmos para llevar cada uno a la concentración de herbicida deseada (1, 3 o 6 mg l⁻¹). Estas concentraciones fueron elegidas en función de trabajos previos en micro y mesocosmos, representando concentraciones de glifosato que pueden ser encontradas en ambientes naturales sometidos a una contaminación aguda (Pérez *et al.* 2007, Vera *et al.* 2010). Por otro lado, los **mejillones** fueron cuidadosamente recolectados durante un período de aguas bajas de paredones de concreto cercano a la costa a los que estaban adheridos, en el tramo inferior del delta del Río Paraná, en la localidad de San Fernando (34°25'34''S, 58°32'36''O), Provincia de Buenos Aires. Se llevaron en seco al laboratorio y fueron dispuestos en peceras de 16 litros con agua de

red declorada y con suministro continuo de aire. Durante el período previo al experimento, los mejillones fueron aclimatados a una temperatura ambiente de 24°C y alimentados con alimento para larvas de peces (*babyfish food Vita Fish*). Con la intención de manipular lo menos posible a los mejillones, se separaron grupos de individuos adheridos entre sí en tamaños de aproximadamente 200 g de peso húmedo (350 ± 15 organismos por unidad experimental), y se los colocó en una pequeña jaula de malla plástica con tamaño de poro de 5 mm. Cada jaula con mejillones vivos fue dispuesta en los microcosmos correspondientes a los tratamientos con *Limnoperna fortunei* (+Lf) dentro de cada tanque, a una profundidad aproximada de 20 cm de la superficie del agua (Fig. 25).



Figura 25: jaula de malla plástica con mejillones (*Limnoperna fortunei*) vivos.

v) Variables de medición

a) Variables físico-químicas

En cada fecha de muestreo (días 0, 1, 7, 14 y 25), se midieron *in situ* con un sensor multiparamétrico de campo Hach® las siguientes variables fisicoquímicas del agua de cada microcosmos: temperatura, pH, conductividad y oxígeno disuelto. Adicionalmente, durante los primeros 5 días experimentales se utilizaron dispositivos electrónicos de medición continua de temperatura “THERMO BUTTON Data Logger”, que fueron dispuestos dentro de cada microcosmos a una profundidad aproximada de 50 cm de la superficie, para registrar cada media hora la temperatura del agua. Por otro lado, se tomó una muestra discreta de 100 ml del agua de cada unidad

experimental que fue utilizada, en parte, para estimar la turbidez (en NTU) con un turbidímetro portátil Hach® 2100P. El resto de la muestra fue conservada a -20°C para el posterior análisis de la concentración de glifosato en agua. Para las determinaciones de glifosato se utilizó la misma metodología descrita en la Sección I de esta Tesis (pág. 33).

Por otra parte, se tomó una muestra de 250 ml de agua subsuperficial de cada microcosmos para cuantificar los nutrientes disueltos (nitratos+nitritos, fosfatos y amonio) y totales (nitrógeno y fósforo) así como también los sólidos en suspensión. Los nutrientes disueltos fueron medidos en laboratorio el mismo día en que se tomaron las muestras. Para esto, se filtró cada muestra de agua utilizando filtros de fibra de vidrio de 0,7 µm de poro (Whatman® GF/F) y se utilizó el *kit* de reactivos Hach® para cuantificar por espectrofotometría. El fósforo reactivo soluble ($P-PO_4^{3-}$) se analizó empleando el método de ácido ascórbico, el nitrato + nitrito ($N-NO_3^- + N-NO_2^-$) según el método de reducción a nitrito con cadmio (Mackereth *et al.* 1978) y el amonio ($N-NH_4^+$) según el método del salicilato (APHA 2005). El límite de detección para la determinación de nutrientes fue de 0,001 mg l⁻¹. Los nutrientes totales (fósforo y nitrógeno) se cuantificaron de la misma manera que el fósforo reactivo soluble y el nitrato + nitrito luego de digerir la muestra original (sin filtrar) con persulfato de potasio (APHA 2005) para llevar los nutrientes particulados a solubles y ser cuantificados como tales.

Los sólidos totales en suspensión (STS) se estimaron filtrando un volumen conocido de muestra de agua (100-200 ml) con filtros de 1,2 µm de poro (Whatman™ GF/C) previamente secados y pesados. El extracto filtrado fue luego pesado en estufa (60-70°C) hasta peso constante (APHA 2005).

b) Variables biológicas

(b.i) Picoplancton y Fitoplancton

En frascos de 100-200 ml se colectaron muestras de agua subsuperficial para luego realizar análisis cuantitativo del fitoplancton y picoplancton (Fig. 26). Las muestras cualitativas del fitoplancton (micro + nanoplancton) fueron tomadas una única vez, a tiempo inicial de cada tanque de acuicultura (antes de armar los microcosmos)

utilizando red de 15 μm de poro, fijadas con formaldehído al 2%. Las muestras fueron observadas bajo microscopio óptico Olympus CX31, para identificar los grandes grupos (a nivel Clase), aunque a veces hasta género, de las poblaciones de microfitoplancton ($> 20 \mu\text{m}$) y nanofitoplancton (2-20 μm) utilizando bibliografía específica. Los recuentos fueron realizados a partir de muestras tomadas en los tanques de acuicultura y posteriormente en cada microcosmos en todas las fechas. Las muestras fueron tomadas subsuperficialmente y fijadas con lugol acético a una concentración final del 1%, y observadas en cámaras de sedimentación bajo microscopio invertido a 400x según Utermöhl (1958). Se contó el número de campos suficientes para alcanzar un error menor al 20% que fue estimado siguiendo a Venrick (1978) en un microscopio invertido Olympus® CKX 41. En el caso de los individuos filamentosos se estimó el número promedio de células por filamento para luego utilizar ese promedio como medida de un único organismo. Para las algas coloniales, se consideró cada colonia como un individuo (e.g. un grupo de 4 células de *Kirchneriella* spp. equivale según los recuentos a un individuo). Se contabilizó el número de algas muertas en cada microcosmos, considerando aquellos individuos en estado avanzado de deterioro, rotos o sin contenido citoplasmático. Para el análisis del picoplancton, se tomaron muestras de agua subsuperficiales las que fueron fijadas con glutaraldehído al 2%. Posteriormente se filtró la muestra a través de filtros negros de policarbonato (0,2 μm) para realizar los recuentos mediante microscopía de epifluorescencia según la metodología descrita en Allende *et al.* (2009) que involucra el uso de distintos filtros para la observación del picoplancton autotrófico, tanto eucariota como las picocianobacterias. Para las bacterias se utilizó el mismo filtro que para el picoplancton con la previa tinción del ADN con DAPI para poder contabilizar las células mediante la excitación con luz UV. La filtración de las muestras para picoplancton autotrófico y bacterioplancton fue realizada durante la misma jornada de muestreo, y los filtros fueron guardados en frío (-20°C), para ser posteriormente analizados bajo microscopio.

Los filtros Whatman® GF/F utilizados para las muestras de nutrientes disueltos fueron envueltos en papel de aluminio y conservados a -20°C para la posterior determinación de la concentración de clorofila-*a* (Chl-*a*) fitoplanctónica a partir de un volumen conocido filtrado. La Chl-*a* se estimó por espectrofotometría, según la

metodología descrita en Marker *et al.* (1980). A cada filtro se le agregó 8 ml de etanol caliente (60-70°C) y posteriormente se dejó reposar una noche en heladera a 4°C para aumentar la eficiencia de extracción del pigmento. Al día siguiente, se centrifugó cada muestra durante 10 minutos a 3.000 rpm, y se midió la absorbancia a 665 y 750 nm en un espectrofotómetro Beckman, utilizando etanol puro como blanco para las muestras. Para no sobreestimar la concentración de clorofila-*a* por presencia de feopigmentos (el producto de degradación de la clorofila), luego de cada lectura, se acidificó la muestra con 0,1 ml de HCl 0,1 N, y se volvió a leer a las mismas longitudes de onda. La concentración de Chl-*a* se calculó según la fórmula propuesta por Lorenzen (1967):

$$\text{Chl-}a \text{ activa} = F [(\text{Abs}_{665} - \text{Abs}_{750}) - (\text{Abs}^{\text{ac}}_{665} - \text{Abs}^{\text{ac}}_{750})] * kV$$

Donde **Abs** es la Absorbancia antes de acidificar la muestra y **Abs^{ac}** es la absorbancia de los feopigmentos una vez acidificada la muestra; **F** es un factor de corrección para equiparar la reducción en la absorbancia con la Chl-*a* inicial (2,43 para el etanol); **k** es el coeficiente de absorbancia específica de la Chl-*a* (11,2 para el etanol) y **V** es el volumen del extracto (ml)/volumen de muestra filtrada (L).



Figura 26: toma de muestras de agua de los microcosmos durante el experimento.

(b.ii) Zooplancton

Dado que la toma de muestras para recuentos de zooplancton requiere de la filtración de un gran volumen de agua, a tiempo inicial se tomó de cada tanque de acuicultura una muestra (70 L) de la misma agua que fue posteriormente usada para llenar las bolsas de cada tratamiento. En el tiempo final y en cada microcosmos, se colectaron muestras para cuantificar el zooplancton, filtrando un volumen conocido de agua (50 L) con una red de zooplancton de 55 µm de poro. Los recuentos del

zooplancton fueron realizados por el investigador Rodrigo Sinistro del laboratorio de Limnología de la FCEyN. Las muestras de micro y protozooplancton fueron analizadas bajo un microscopio binocular en cámaras Sedgwick-Rafter de 1 ml, obteniendo las submuestras con una pipeta Hensen-Stempel. Los recuentos del macrozooplancton fueron realizados en cámaras de 5 ml Bogorov bajo lupa, y las submuestras tomadas con un dispositivo de Russell según José de Paggi y Paggi (1995). Se identificaron los diferentes grupos taxonómicos del zooplancton a nivel género, y cuando fue posible a nivel especie, discriminándose los estadios larvales en el caso de los copépodos. Se contabilizaron tres alícuotas de cada muestra, salvo en los casos en los que se requirió contar un número mayor a fin de obtener una estimación del error menor al 10%. Las abundancias del zooplancton fueron expresadas como individuos por litro.

(b.iii) Perifiton

En cuanto a la comunidad perifítica, en cada muestreo se tomaron 4 sustratos por *perifitómetro* que fueron cuidadosamente raspados en laboratorio para separar la comunidad adherida de cada sustrato y estimar las variables de masa (peso seco, cenizas y peso seco libre de cenizas), como también para cuantificar la concentración de clorofila-*a* y realizar análisis cualitativos y cuantitativos de la fracción algal del perifiton (Fig. 27).

Se estimaron las distintas fracciones de masa del perifiton: el peso seco (PS) que representa la totalidad de la comunidad, las cenizas (C) que conforman la fracción inorgánica y el peso seco libre de cenizas (PSLC), es decir, la fracción orgánica del perifiton. El material raspado del sustrato artificial se lo filtró a través de filtros (Whatman® GF/C) previamente calcinados (en mufla a 440°C durante 2 hs) y pesados a temperatura ambiente. Se filtró la muestra de agua a través de los filtros calcinados, que fueron luego secados en estufa (60-70°C) hasta peso constante para obtener el PS. Los filtros fueron pesados en una balanza de precisión (error 0,0001 g) y posteriormente se calcinó nuevamente cada filtro, y se volvieron a pesar, para obtener el peso de la fracción inorgánica del perifiton (C). El PSLC se calculó con la diferencia entre PS y C (APHA 2005).

La concentración de clorofila-*a* perifítica fue estimada a partir del material raspado y filtrado a través de filtros Whatman® GF/F. El tratamiento de los filtros, la extracción

del pigmento y su cuantificación se realizó aplicando la misma metodología que para la clorofila-*a* fitoplanctónica, explicado anteriormente. Además, se calculó el índice autotrófico (IA) de la comunidad perifítica a partir de la relación entre la concentración de clorofila-*a* y el PSLC ($IA = PSLC/Chl-a$) (APHA 2005), como un indicador de la calidad trófica (dominancia de autotrofia o heterotrofia) de la comunidad en cada tratamiento. Los valores de IA inferiores a 100-200 generalmente indican una comunidad de perifiton con una alta proporción de algas viables en la que los procesos productivos superan a los heterótrofos, mientras que valores superiores a 400 sugieren preponderancia de organismos heterotróficos y/o alta concentración de detrito orgánico, en donde la respiración supera a la producción (APHA 2005, Biggs y Close 1989, Lowe y Pan 1996).

La observación de las muestras cualitativas y los recuentos de la fracción algal del perifiton fueron desarrollados de la misma manera que para el fitoplancton luego del raspado del material y su suspensión en agua. Los recuentos fueron realizados sólo para tiempo inicial y tiempo final. Las variables de masa y los recuentos del perifiton, así como la medición de la clorofila-*a* del fitoplancton fueron realizadas con la colaboración de la estudiante Marina Ramírez.



Figura 27: extracción de sustratos colonizados con perifiton en cada fecha de muestreo

(b.iv) *Limnoperna fortunei*

Una vez finalizado el experimento se retiraron las jaulas con los mejillones (Fig. 28) y los individuos de *Limnoperna fortunei* utilizados en cada microcosmos fueron contados y medidos con el uso de un calibre digital (marca Sylvac) con precisión de 0,01 mm. A la mitad de ellos se les extrajo el tejido blando que fue posteriormente

secado en estufa a 60-70°C hasta peso constante, para evaluar posibles diferencias en el desarrollo del tejido blando de *L. fortunei* expuesto a diferentes concentraciones de glifosato. Si bien a partir de los resultados de la Sección I podíamos suponer que las concentraciones de glifosato utilizadas aquí (hasta 6 mg l⁻¹) no afectarían la supervivencia de los mejillones, al finalizar el experimento, se contabilizó para cada microcosmos el número de organismos muertos, identificados como aquéllos mejillones con valvas abiertas y con poco o ningún tejido blando en su interior. No se observó un porcentaje relevante de organismos muertos por tratamiento (siempre menor al 2%), ni tampoco diferencias entre las distintas concentraciones de glifosato.



Figura 28: extracción de individuos de *Limnoperna fortunei* de cada microcosmos a tiempo final.

vi) Análisis estadístico

Cada variable fue analizada estadísticamente mediante ANOVA de Medidas Repetidas, evaluando previamente los supuestos del modelo. Cuando fue necesario, se aplicó una transformación a las variables (generalmente Logaritmo) para cumplir con el supuesto de esfericidad. Para las comparaciones (dentro de las variables de fósforo y nitrógeno total, como también para las abundancias relativas dentro de las comunidades analizadas) se llevaron a cabo ANOVAS de un factor para las comparaciones *a-priori* y *a-posteriori* según las hipótesis de cada caso (Zar 1996). Se realizaron regresiones lineales simples para evaluar la relación entre el fósforo total y la concentración de glifosato en cada tiempo de muestreo, y se repitió el mismo procedimiento para el fósforo reactivo soluble. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el Software SPSS®.

Resultados

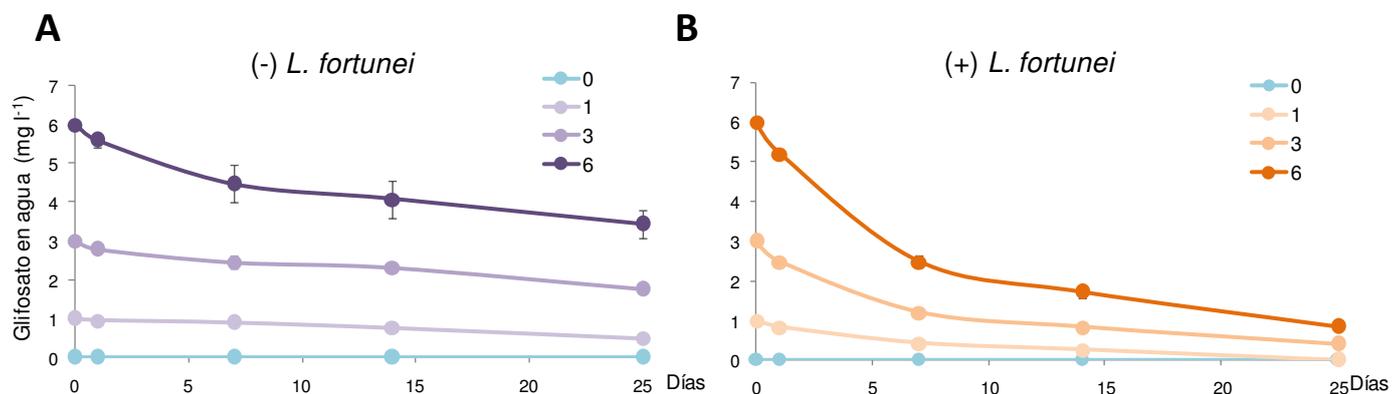
i) Glifosato en agua

La concentración de glifosato disuelto en agua disminuyó gradualmente en todos los tratamientos con herbicida a lo largo del período experimental (Fig. 29). En ausencia de *Limnoperna fortunei* (Fig. 29 A) esta disminución fue significativa en relación al tiempo inicial ($p < 0,01$) en los tratamientos **3-Lf** y **6-Lf**, alcanzando concentraciones promedio a tiempo final de $1,75 \pm 0,02 \text{ mg l}^{-1}$ y $3,43 \pm 0,35 \text{ mg l}^{-1}$ respectivamente, lo que significó un decaimiento de entre 41-43% respecto a las concentraciones a tiempo inicial. En el caso de la dosis más alta de herbicida (**6-Lf**) el decaimiento en la concentración de glifosato resultó significativa a partir de las 24 h mientras que para la dosis media, esta disminuyó significativamente respecto al valor inicial recién al día 25. En el tratamiento **1-Lf**, en cambio, la disminución fue menor, alcanzando a tiempo final un valor promedio de $0,49 \pm 0,06 \text{ mg l}^{-1}$.

En cuanto a los tratamientos con presencia de *Limnoperna fortunei* (Fig 29 B), el decaimiento en la concentración de glifosato en agua fue más abrupta, llegando a reducirse hacia el final del experimento en un 100% en el tratamiento **1+Lf** y en un 86% en los tratamientos con mayores dosis (**3+Lf** y **6+Lf**). En **1+Lf** a tiempo final la concentración de glifosato no fue detectable en ninguna de sus réplicas mediante la técnica de cuantificación utilizada, diferenciándose significativamente ($p < 0,01$) de la concentración inicial. Con dosis media de herbicida (**3+Lf**), la concentración de glifosato en agua disminuyó significativamente ($p < 0,01$) durante la primera semana y en el tratamiento con mayor dosis (**6+Lf**) ya se observaron diferencias estadísticas ($p < 0,01$) durante las primeras 24 h experimentales. Los valores de herbicida a tiempo final promediaron $0,41 \pm 0,08 \text{ mg l}^{-1}$ y $0,84 \pm 0,10 \text{ mg l}^{-1}$ para los tratamientos **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente y fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

El coeficiente de disipación (**k**) del glifosato en agua se vio modificado por la presencia del mejillón, siendo significativamente mayor ($p < 0,01$) en tratamientos con *Limnoperna fortunei*. La vida media promedio del glifosato registrada fue de $33,4 \pm 4,3$ días en ausencia de mejillón ($k = 0,022 \pm 0,002 \text{ mg d}^{-1}$) y de $8,7 \pm 0,6$ días con *L. fortunei*

($k = 0,081 \pm 0,004 \text{ mg d}^{-1}$), lo que generó una reducción promedio del 74% en la vida media del glifosato.



Figuras 29 A y B: concentración media ($\pm 1 \text{ ES}$) de glifosato (mg l^{-1}) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato. (A) sin *Limnoperna fortunei* (-*L.f.*) y (B) con *Limnoperna fortunei* (+*L.f.*), durante el período experimental.

Resumen: Glifosato en agua

Limnoperna fortunei aceleró la tasa de disipación del glifosato en agua en casi 4 veces.

En adelante y, para facilitar la comprensión de los resultados, los datos serán presentados analizando el “Efecto *L. fortunei*” (tratamientos sin el agregado de herbicida: **0-Lf** y **0+Lf**), el “Efecto glifosato” (tratamientos sin la presencia del mejillón: **0-Lf**; **1-Lf**; **3-Lf** y **6-Lf**) y el “Efecto de interacción glifosato-*L. fortunei*” (tratamientos con la presencia conjunta de ambos factores de cambio: **0+Lf**; **1+Lf**; **3+Lf** y **6+Lf**).

ii) Variables físico-químicas

a) Oxígeno disuelto

Al momento de comenzar el experimento se cuantificaron altas concentraciones de oxígeno disuelto en todos los microcosmos, con un promedio (\pm error estándar) de $9,00 \pm 0,17 \text{ mg l}^{-1}$ para un rango de temperaturas entre 21 y 28°C.

Efecto *L. fortunei*: en los tratamientos sin herbicida, tanto en ausencia como en presencia de mejillón (tratamientos **0-Lf** y **0+Lf** respectivamente), el oxígeno disuelto a lo largo de la experiencia fue siempre mayor a 7 mg l^{-1} (Fig. 30 A), asegurando condiciones óptimas para el desarrollo de los organismos del sistema (Wetzel 2001). La presencia de *Limnoperna fortunei* alteró significativamente la concentración de oxígeno

disuelto, generando una rápida disminución ($p < 0,05$) durante las primeras 24 h, que fue luego recuperándose gradualmente hasta llegar a ser mayor el oxígeno disuelto a tiempo final en presencia de mejillón ($p < 0,05$), respecto al tratamiento **0-Lf**, con promedios de $8,8 \pm 0,1$ y $9,4 \pm 0,7$ mg l^{-1} en **0-Lf** y **0+Lf** respectivamente.

Efecto Glifosato: el glifosato no afectó la concentración de oxígeno disuelto (Fig. 30 B); el oxígeno bajó levemente en todos los tratamientos durante la primera semana hasta alcanzar valores de $7,96 \pm 0,11$ mg l^{-1} ($p < 0,05$ respecto al tiempo inicial), para luego recuperarse durante las dos semanas siguientes hasta alcanzar valores de $9,20 \pm 0,02$ mg l^{-1} .

Efecto Interacción: en los microcosmos con *Limnoperna fortunei*, en los que se analiza la interacción de los dos factores antropogénicos (Fig. 30 C), el oxígeno disuelto tuvo un rápido descenso durante las primeras 24 h para todos los tratamientos que también resultó significativo ($p < 0,05$) respecto a los valores iniciales, alcanzando un promedio de $6,70 \pm 0,13$ mg l^{-1} . Posteriormente, fue gradualmente aumentando hasta un valor promedio de $9,91 \pm 0,24$ mg l^{-1} a tiempo final.

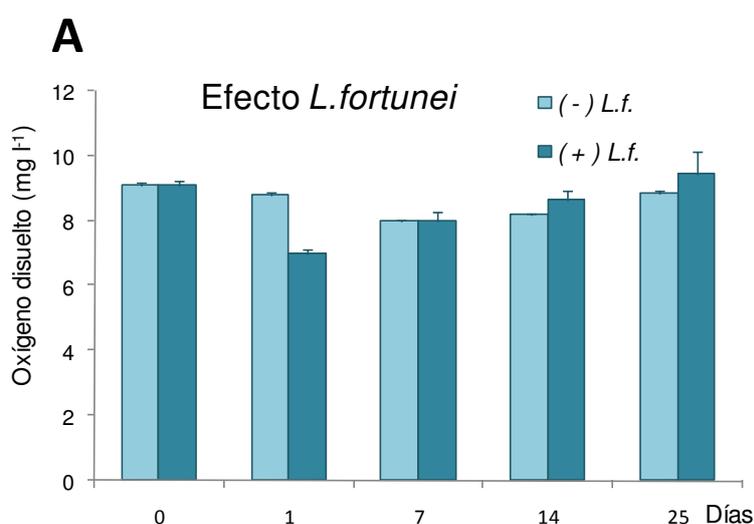
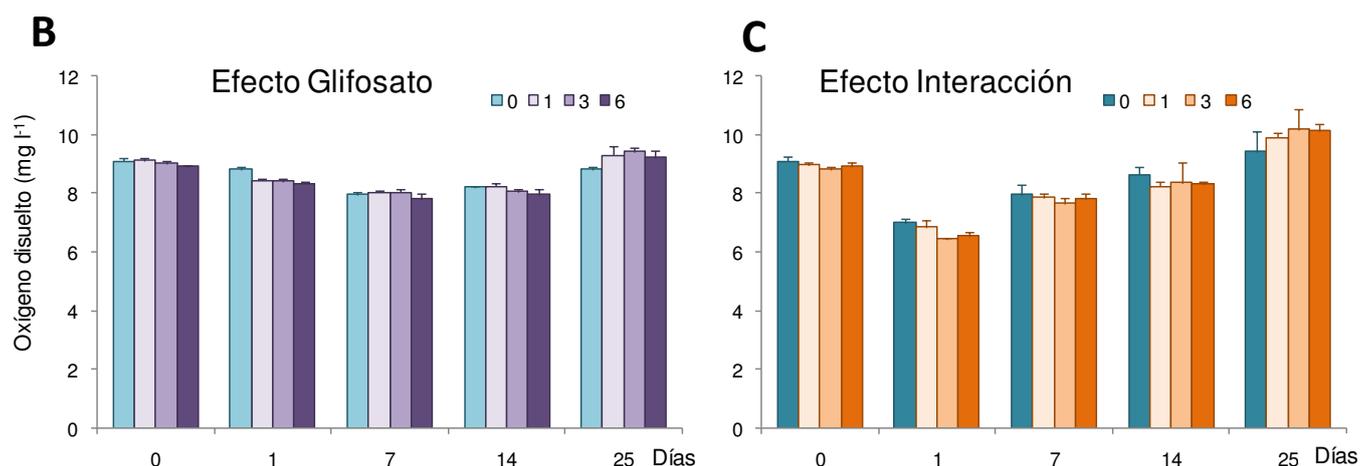


Figura 30 A: concentración media (+ 1 ES) de oxígeno disuelto (mg l^{-1}) para los tratamientos sin glifosato, sin (-L.f.) y con (+L.f.) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental.



Figuras 30 B y C: concentración media (+ 1 ES) de oxígeno disuelto (mg l^{-1}) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental.

Resumen: Oxígeno disuelto en agua

- Efecto *L. fortunei*: la presencia de los mejillones generó una rápida disminución en el oxígeno durante las primeras 24 h, que con el tiempo se recuperó, alcanzando a tiempo final concentraciones de oxígeno significativamente mayores respecto a microcosmos sin mejillón.
- Efecto Glifosato: no se observaron diferencias entre tratamientos.
- Efecto Interacción: no se observó efecto conjunto sobre el oxígeno disuelto que fuera diferente al de los factores por separado. La presencia del mejillón es la que modula el comportamiento de esta variable.

b) pH

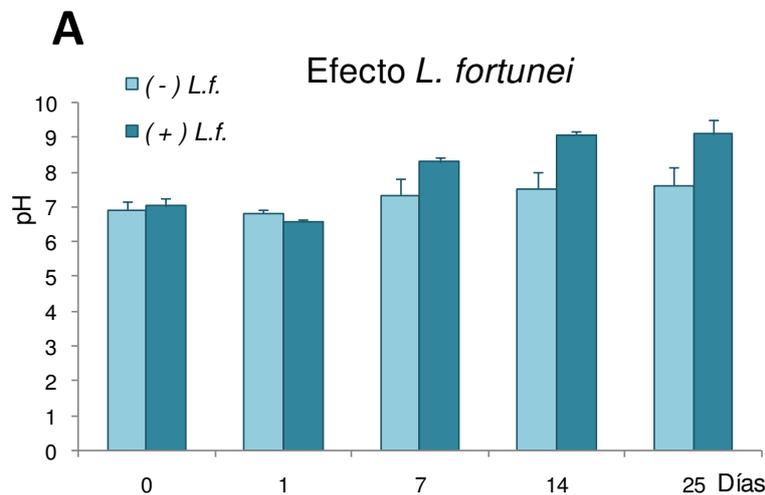
Los valores iniciales de pH en los microcosmos indicaron aguas circumneutrales (media = $7,02 \pm 0,19$).

Efecto *L. fortunei*: la presencia de *Limnoperna fortunei* generó diferencias entre los tratamientos, siendo significativamente más alcalinas las aguas en presencia de mejillón a partir de la primera semana (día 7) ($p < 0,01$) (Fig. 31 A). En ambos tratamientos los máximos valores de pH se midieron a tiempo final (promedio de $7,6 \pm 0,9$ y $9,10 \pm 0,70$ para **0-Lf** y **0+Lf** respectivamente).

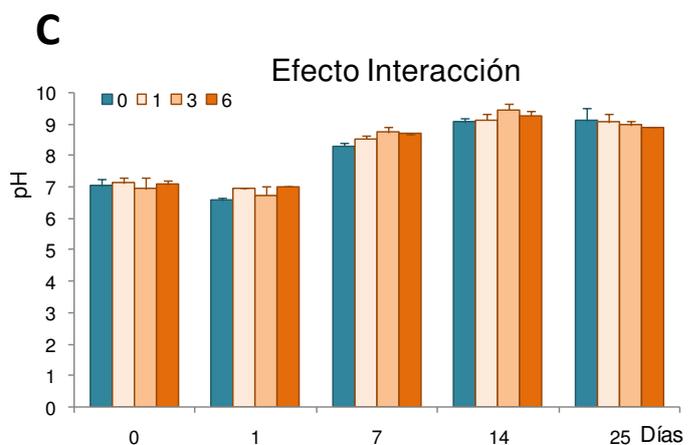
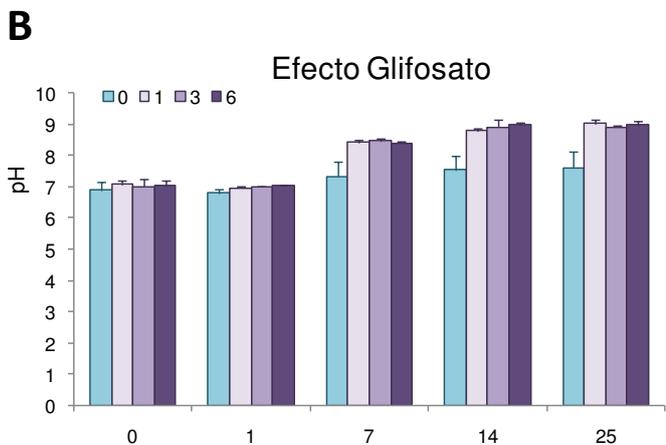
Efecto Glifosato: en los tratamientos sin mejillón se observó un rápido ascenso del pH ($p < 0,01$) durante la primera semana hacia aguas alcalinas alcanzando valores entre 8,4 y 9 (Fig. 31 B). A partir del día 7 y en adelante, el tratamiento control se diferenció

estadísticamente de los microcosmos con herbicida, con pH significativamente menores ($p < 0,05$) en ausencia de glifosato (**0-Lf**).

Efecto Interacción: en los tratamientos con mejillón, el pH aumentó significativamente ($p < 0,01$) tanto durante la primera semana (entre los días 1 y 7) como durante la segunda semana (entre los días 7 y 14) (Fig. 31 C). Los valores más altos de pH se obtuvieron al día 14 en los tratamientos con ambos factores (**1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf**) con promedios entre 9,1 y 9,5 no obstante, estos valores no se diferenciaron estadísticamente del pH alcanzado en los tratamientos sin mejillón (**1-Lf**, **3-Lf** y **6-Lf**). Si bien se puede ver en la figura un leve descenso del pH en los tratamientos con dosis media y alta de glifosato durante la última semana experimental (**3+Lf** y **6+Lf**), esta variación no resultó estadísticamente significativa.



31 A: concentración media (+ 1 ES) de pH en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L. f.*) y con (+ *L. f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 31 B y C: concentración media (+ 1 ES) de pH para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental.

Resumen: pH

- Efecto *L. fortunei*: la presencia de los mejillones generó un aumento más pronunciado del pH del agua, siendo estadísticamente mayor a partir de la primera semana.
- Efecto Glifosato: el herbicida favoreció el aumento del pH siendo significativamente mayor respecto al control a partir de la primera semana.
- Efecto Interacción: no se observó un efecto conjunto sobre el pH diferente al de los factores por separado.

c) Temperatura

Los valores iniciales de la temperatura del agua en los microcosmos promediaron $25,0 \pm 0,2$ °C. Si bien la temperatura del agua no se vio afectada ni por el glifosato ni por *Limnoperna fortunei*, ésta varió significativamente ($p < 0,01$) a lo largo del tiempo debido principalmente a cambios en la temperatura del aire (Fig. 32 A, B y C). A la semana (día 7) se observó un aumento pronunciado de la temperatura del agua en todos los tratamientos alcanzando valores superiores a 28 °C y luego fue gradualmente descendiendo durante el resto del experimento hasta valores cercanos a 21 °C. Es importante destacar que en el día 20 del período experimental hubo una intensa lluvia durante toda la noche en la que cayeron 22 mm de agua (Servicio Meteorológico Nacional) y los tanques se encontraban descubiertos, por lo que sufrieron el aporte de agua de lluvia, viéndose afectadas las variables fisicoquímicas estudiadas.

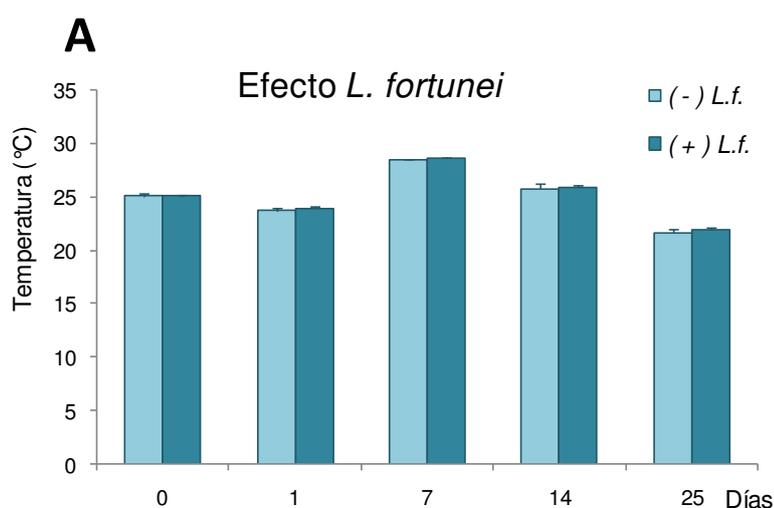
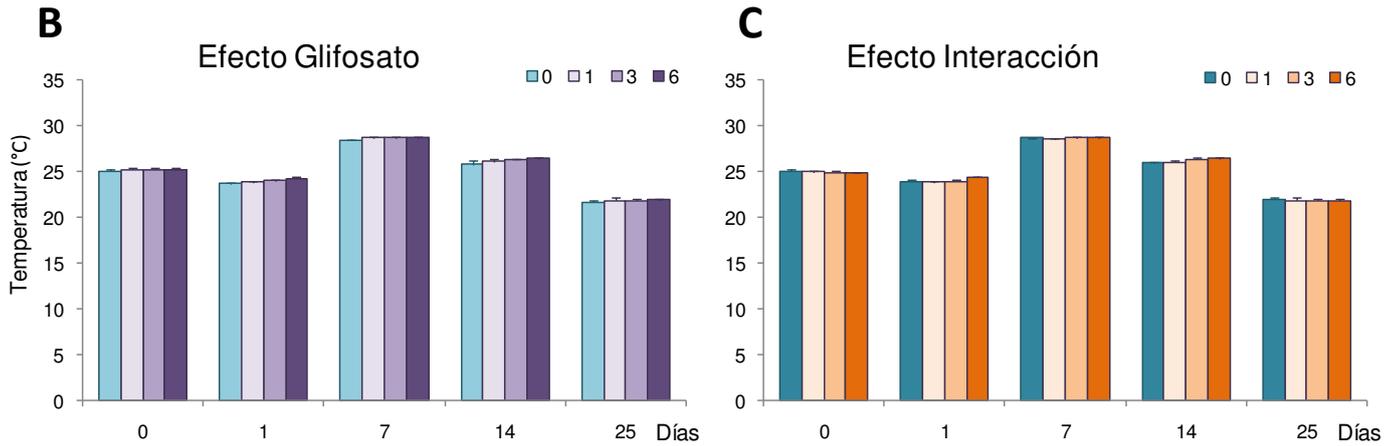


Figura 32 A: concentración media (+ 1 ES) de temperatura del agua (°C) en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L. f.*) y con (+ *L. f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 32 B y C: concentración media (+ 1 ES) de temperatura del agua (°C) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental.

De acuerdo a la medición continua (cada 30 minutos) de la temperatura del agua de los microcosmos registrada por los Data Loggers, se puede observar que la variación diaria de temperatura fue semejante en todos las unidades experimentales (Fig. 33). Los microcosmos a la intemperie estuvieron sujetos a la variación ambiental, observándose claramente las variaciones diarias en temperatura, lo que demuestra que las unidades experimentales resultaron ser representativas de ambientes naturales de poca profundidad.

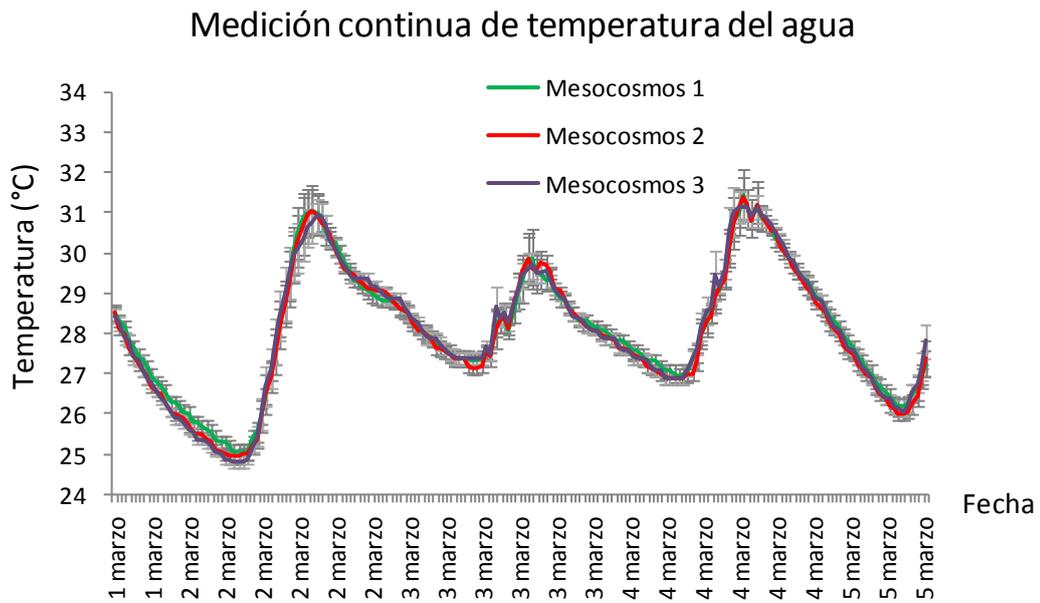


Figura 33: valores promedio (+ 1 ES) de temperatura del agua (°C) en los tres tanques de acuicultura (mesocosmos). La medición se realizó en cada uno de los 24 microcosmos automáticamente cada 30 minutos durante los primeros 5 días experimentales (1-5 marzo) con THERMO BUTTONS Data Loggers.

Resumen: Temperatura del agua

- Efecto *L. fortunei*: no se detectó efecto.
- Efecto Glifosato: el herbicida no tuvo efecto sobre la temperatura del agua.
- Efecto Interacción: no hubo variación de temperatura en los tratamientos que evaluaron la interacción.

d) Conductividad

Los valores iniciales de conductividad en los microcosmos promediaron $140,1 \pm 1,0 \mu\text{S cm}^{-1}$. En todos los tratamientos la variación de la conductividad del agua en el tiempo fue semejante, aumentando gradualmente hasta alcanzar el máximo valor al día 14, para luego decrecer drásticamente durante la última semana. La magnitud de la variación, no obstante, dependió del tipo de tratamiento (Fig. 34).

Efecto *L. fortunei*: se observó un efecto del mejillón sobre la conductividad del agua (Fig. 34 A). Si bien el patrón de comportamiento fue el mismo en los dos tratamientos, en ausencia de mejillón (**0-Lf**) la conductividad fue significativamente mayor ($p < 0,01$) respecto a **0+Lf**, para los días 7, 14 y 25.

Efecto Glifosato: la conductividad no varió con el factor glifosato, siendo el comportamiento de dicha variable semejante en todos los tratamientos sin mejillón, independientemente de la concentración de herbicida (Fig. 34 B). Durante las primeras 24 h la conductividad se mantuvo estable en los microcosmos, y comenzó a ascender gradualmente durante las primeras dos semanas ($p < 0,01$ a partir del día 7), alcanzando al día 14 valores promedio entre $152\text{-}156 \mu\text{S cm}^{-1}$. Durante la última semana la conductividad descendió drásticamente ($p < 0,01$) a valores promedio de entre $138\text{-}140 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Efecto Interacción: en presencia de herbicida, en los tratamientos con *Limnoperna fortunei* la conductividad aumentó recién al día 14 ($p < 0,01$), con promedios entre $146\text{-}150 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Fig. 34 C). Durante la última semana del experimento la conductividad también bajó significativamente ($p < 0,01$) a valores promedio entre $128\text{-}132 \mu\text{S cm}^{-1}$. A partir del día 7 y en adelante, la conductividad fue significativamente menor ($p < 0,01$) en los tratamientos con mejillón respecto a aquellos sin mejillón. Si bien se observó a partir del día 14 una mayor conductividad en los tratamientos con herbicida (**1+Lf**, **3+Lf**

y **6+Lf**), este aumento no resultó estadísticamente significativo. Nuevamente, es importante considerar que durante la última semana experimental (al día 20), se registró una intensa lluvia que evidentemente afectó a los microcosmos, posiblemente explicando el descenso de la conductividad en todos los tratamientos durante dicho período.

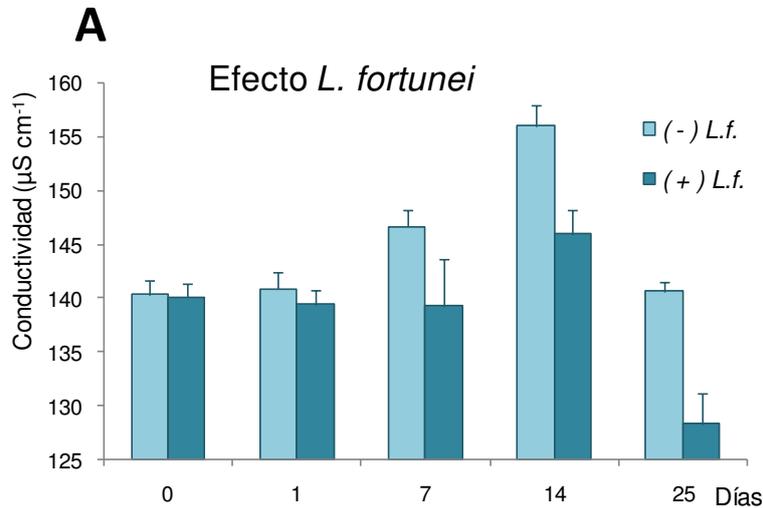
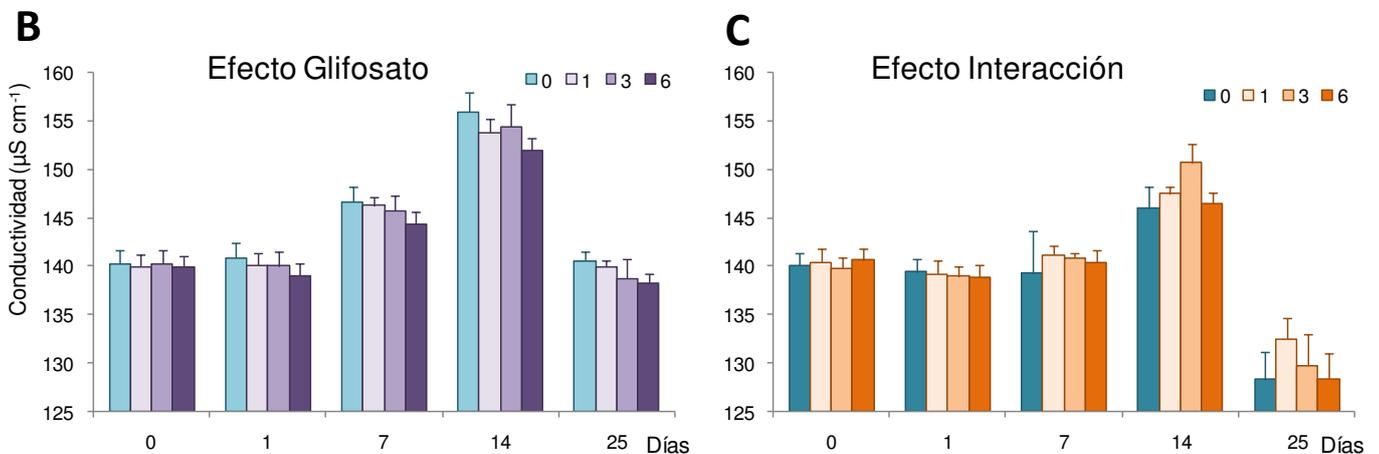


Figura 34 A concentración media (+ 1 ES) de conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$) en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 34 B y C: concentración media (+ 1 ES) de conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental.

Resumen: Conductividad

- Efecto *L. fortunei*: en presencia de mejillón la conductividad fue significativamente menor a partir de la primera semana experimental.
- Efecto Glifosato: sin efecto evidente.
- Efecto Interacción: no se observó un efecto de la interacción sobre la conductividad.

Análisis del agua de los tanques:

Durante el experimento se midieron variables físico-químicas (oxígeno disuelto, pH, temperatura y conductividad) del agua de cada uno de los tres tanques de acuiculturas donde fueron dispuestos los microcosmos para evaluar posible efecto confinamiento (Tabla 4). De acuerdo a dichas variables y excepto para el oxígeno disuelto, el confinamiento en microcosmos de 75 litros no generó variación significativa en las condiciones físico-químicas del agua al compararlas con los valores obtenidos dentro de los microcosmos control (**0-Lf**) en los días respectivos. En el caso del oxígeno disuelto, este fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los microcosmos respecto de los tanques de acuicultura para todas las fechas de muestreo, debido probablemente a la oxigenación constante provista por los aireadores.

	Día 0	Día 1	Día 7	Día 14	Día 25
Oxígeno disuelto (mg l^{-1})	$8,3 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2$	$6,4 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,1$
pH	$7,2 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,6$	$7,4 \pm 0,7$	$7,5 \pm 0,7$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$25,1 \pm 0,2$	$24,3 \pm 0,1$	$29,0 \pm 0,1$	$26,2 \pm 0,1$	$22,4 \pm 0,1$
Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	$139,6 \pm 1,4$	$139,8 \pm 1,3$	$146,2 \pm 7,1$	$158,0 \pm 11,1$	$154,4 \pm 9,7$

Tabla 4: variables físico-químicas en el agua de los tres tanques de acuicultura (promedio \pm ES) a lo largo del período experimental.

e) Nutrientes*(e.i) Fósforo total (PT)*

Los valores iniciales de (PT) en los tanques promediaron $0,07 \pm 0,01 \text{ mg l}^{-1}$, representando valores característicos de cuerpos de agua meso-eutróficos (Wetzel 2001) (Fig. 35).

Efecto *L. fortunei*: el PT fue bajo tanto en **0-Lf** como en **0+Lf** durante todo el experimento, con valores siempre menores a $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ (Fig. 35 A). No se observaron diferencias significativas en los niveles de PT entre los tratamientos con y sin mejillones a lo largo de la experiencia.

Efecto Glifosato: al evaluar el efecto del herbicida (Fig. 35 B), se observó que el PT aumentó durante las primeras 24 h, alcanzando valores promedio de $0,18 \pm 0,01 \text{ mg l}^{-1}$; $0,47 \pm 0,02 \text{ mg l}^{-1}$ y $0,79 \pm 0,15 \text{ mg l}^{-1}$ para **1-Lf**, **3-Lf** y **6-Lf** respectivamente, y se mantuvo relativamente constante durante el resto del experimento. Este aumento abrupto al día 1 resultó ser significativo ($p < 0,05$) respecto a los valores iniciales solo para los tratamientos de 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato.

Efecto Interacción: si bien en los tratamientos que evalúan la interacción se observó un aumento en la concentración de PT durante las primeras 24 h como con el efecto glifosato, posteriormente el PT fue gradualmente disminuyendo (Fig. 35 C). Al día 1 la concentración de PT alcanzó valores promedio de $0,21 \pm 0,04 \text{ mg l}^{-1}$; $0,44 \pm 0,02 \text{ mg l}^{-1}$; y $0,86 \pm 0,05 \text{ mg l}^{-1}$ para **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente, estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para los tratamientos **3+Lf** y **6+Lf**. Posteriormente, el PT en agua fue descendiendo a lo largo del período experimental en todos los tratamientos, siendo significativa su disminución a tiempo final ($p < 0,05$) en **3+Lf** y **6+Lf** con valores promedio al día 25 de $0,24 \pm 0,03 \text{ mg l}^{-1}$ y de $0,46 \pm 0,02 \text{ mg l}^{-1}$ respectivamente, lo que significó una disminución del 23,5% y del 46,5% respecto al día 1.

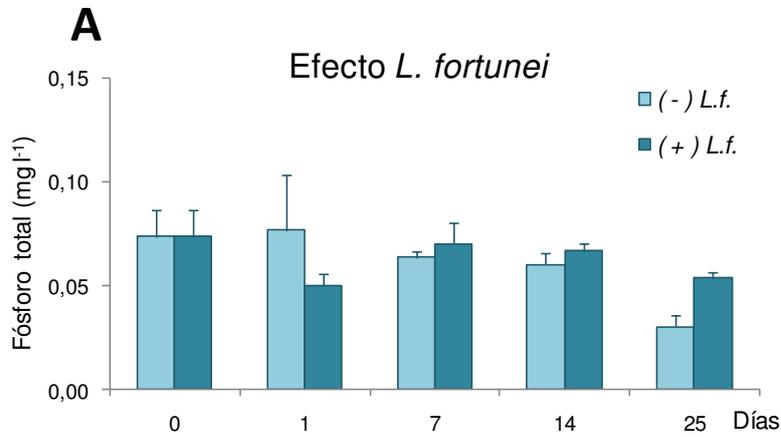
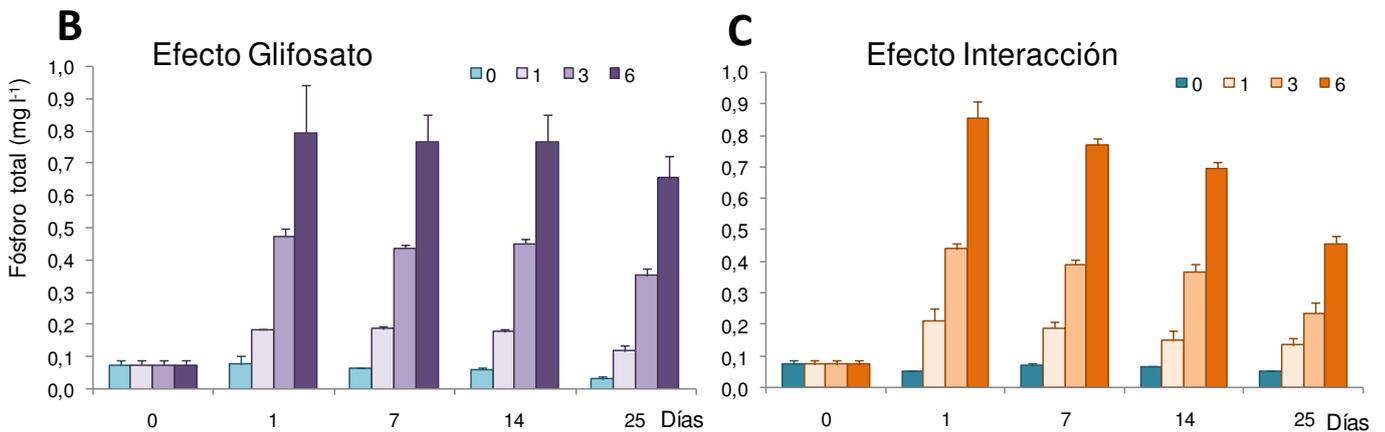


Figura 35 A: concentración media (+ 1 ES) de fósforo total (mg l^{-1}) en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 35 B y C: concentración media (+ 1 ES) de fósforo total (mg l^{-1}) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental.

Para analizar con mayor detalle el comportamiento de esta variable en los distintos escenarios, realizamos regresiones lineales y comparaciones de pendientes. Para cada día de muestreo (excepto el tiempo inicial), se calculó la regresión lineal simple entre cada concentración de glifosato y el fósforo total medido, resultando ser en todas ellas estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Se compararon las pendientes de las regresiones mediante pruebas de paralelismo (Zar 1996) y se observó que en los tratamientos que evalúan el efecto glifosato las pendientes de las regresiones para los distintos días no difirieron entre sí, mientras que en la figura de la interacción glifosato x *Limnoperna fortunei*, la pendiente resultó ser significativamente menor a tiempo final ($p < 0,05$) (Tabla 5). En la Fig. 36 se puede observar las regresiones realizadas para los tratamientos que evalúan el efecto interacción, en donde se destaca que al día 25 la pendiente fue significativamente menor que en las demás fechas. Nuevamente esto nos indica que en los tratamientos con presencia de *L. fortunei* la concentración de glifosato decreció significativamente durante la última semana experimental y este descenso resultó ser más importante en aquellos tratamientos con dosis media y alta de herbicida.

Regresión Lineal Simple	Ecuación	Significancia de Regresión	Coefficiente de determinación (R^2)	Diferencias estadísticas entre pendientes ($\alpha=5\%$)
Efecto Glifosato Día 1	$y = 0,121x + 0,078$	$p < 0,05$	0,867	a
Efecto Glifosato Día 7	$y = 0,117x + 0,070$	$p < 0,05$	0,954	a
Efecto Glifosato Día 14	$y = 0,118x + 0,066$	$p < 0,05$	0,952	a
Efecto Glifosato Día 25	$y = 0,105x + 0,024$	$p < 0,05$	0,952	a
Efecto Interacción Día 1	$y = 0,132x + 0,059$	$p < 0,05$	0,974	a
Efecto Interacción Día 7	$y = 0,115x + 0,065$	$p < 0,05$	0,989	a
Efecto Interacción Día 14	$y = 0,106x + 0,054$	$p < 0,05$	0,982	a
Efecto Interacción Día 25	$y = 0,065x + 0,056$	$p < 0,05$	0,950	b

Tabla 5: resultado de las regresiones lineales simples realizadas para cada día de muestreo entre la concentración de herbicida (variable independiente) y el PT (variable dependiente), en los tratamientos que evaluaron el Efecto Glifosato, y en los que evaluaron el Efecto Interacción. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las pendientes analizadas.

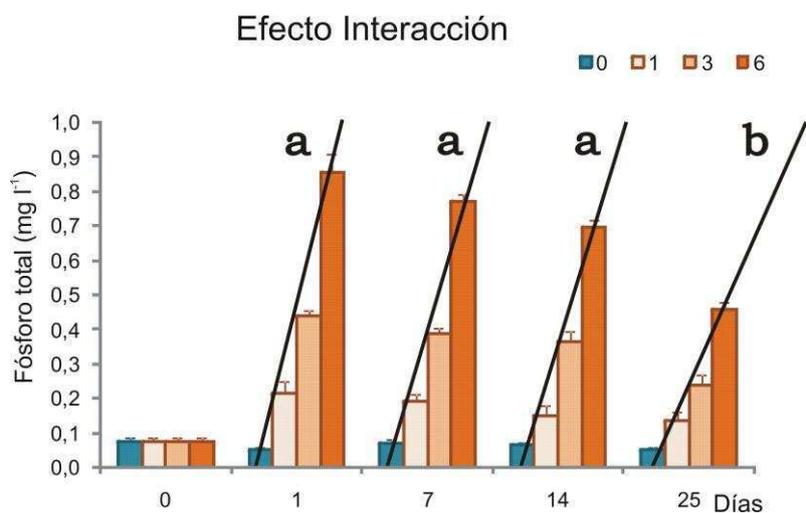


Figura 36: regresión lineal simple para cada día de muestreo en los tratamientos que evaluaron el Efecto Interacción del mejillón *Limnoperna fortunei* y el glifosato sobre el Fósforo total en el agua. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las pendientes de las regresiones.

Con el objetivo de analizar si el aumento del PT durante las primeras 24 h observado se encuentra relacionado al herbicida, se calculó el aporte de fósforo por parte de la molécula de glifosato al PT de la columna de agua en cada tratamiento. Considerando el peso molecular del glifosato ($PM=169$) y la cantidad de fósforo que estaría agregándose a cada tratamiento según la concentración, el herbicida estaría aportando aproximadamente 13, 39 y 77 mg de fósforo al sistema para las concentraciones de 1, 3 y 6 $mg\ l^{-1}$ de glifosato respectivamente. Sin embargo, cuando se compara el aporte de fósforo por parte de la molécula de glifosato con el fósforo total obtenido por diferencia respecto al tiempo inicial, se observa que el fósforo cuantificado a las 24 h en la columna de agua fue levemente menor a aquel esperado a partir de la dosis de glifosato suministrada (Tabla 6). Asimismo, la diferencia entre la concentración de fósforo esperada y la medida dependió de la cantidad inicial de glifosato suministrado, y no así de la presencia o ausencia del mejillón, siendo significativamente mayor a concentraciones crecientes de glifosato (ANOVA 1 factor $p < 0,05$). Sin embargo, si se expresa esta diferencia como porcentaje del fósforo aportado por el glifosato, se observa que esta osciló entre un 25 y un 36%, es decir, que para todas las concentraciones de glifosato el porcentaje de fósforo que se disipó de la columna de agua durante las primeras 24 h (probablemente incorporado a la biomasa del perifiton y de los moluscos) fue aproximadamente de un tercio de la concentración inicial.

<i>L. fortunei</i>	Glifosato inicial (mg l ⁻¹)		
	1	3	6
Sin	36%	26%	25%
Con	26%	33%	29%

Tabla 6: diferencia entre fósforo total esperado según el aporte de glifosato y aquel cuantificado durante las primeras 24 hs para cada tratamiento, expresado como porcentaje del fósforo total aportado por la molécula de glifosato que se disipó de la columna de agua.

Resumen: Fósforo total

- Efecto *L. fortunei*: no se observó efecto del mejillón sobre el fósforo total.
- Efecto Glifosato: el herbicida aportó fósforo a la columna de agua detectándose mayor concentración de fósforo total a mayor concentración de glifosato adicionado.
- Efecto Interacción: se repite el patrón general observado en el efecto glifosato ya que el glifosato aportó fósforo. La presencia de *L. fortunei* redujo significativamente la concentración a tiempo final, en los tratamientos **3+Lf** y **6+Lf**.

(e.ii) Nitrógeno total (NT)

La concentración inicial de NT promedió 2,9 mg l⁻¹, muy superior a los valores de nitrógeno inorgánico disuelto limitantes para la actividad fitoplanctónica de 0,1 mg l⁻¹ según Reynolds (2006).

Efecto *L. fortunei*: a lo largo del experimento el NT en agua se vio afectado por la presencia del mejillón (Fig. 37 A). Si bien se observó un aumento durante las primeras semanas del NT en agua, seguida de una disminución hacia el tiempo final, la concentración de NT en ausencia de *L. fortunei* no varió significativamente. En presencia de mejillón (**0+Lf**), en cambio, el NT sufrió un incremento más pronunciado, alcanzando valores significativamente mayores ($p < 0,01$) al día 14 con un promedio de $9,5 \pm 3,0$ mg l⁻¹, para luego disminuir bruscamente durante la última semana de la experiencia.

Efecto Glifosato: si bien el glifosato aportó nitrógeno a la columna de agua, debido a las altas concentraciones iniciales de NT, este aporte no generó diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 37 B). Durante la primera semana se observó un leve aumento no significativo (excepto para **1-Lf**), hasta valores promedio entre 4,3 y 5,6 mg l⁻¹. Posteriormente el NT disminuyó, especialmente durante la última semana ($p < 0,05$; excepto para **0-Lf**) hasta valores por debajo de aquéllos medidos a tiempo inicial.

Efecto Interacción: se observó un comportamiento semejante al caso del efecto glifosato, excepto en la concentración media de glifosato **3+Lf** en donde se registró un pronunciado y significativo aumento ($p < 0,01$) alcanzando el valor promedio de $17,75 \pm 1,35 \text{ mg l}^{-1}$, para luego disminuir a valores semejantes a los iniciales durante la siguiente semana. Nuevamente, a tiempo final el NT disminuyó significativamente ($p < 0,05$) para todas las concentraciones de glifosato, resultando inferior a aquél medido al día 0 (Fig. 37 C).

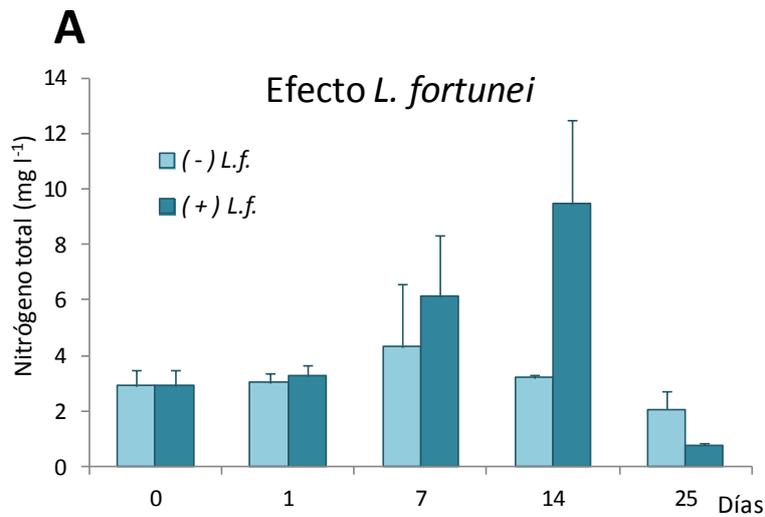
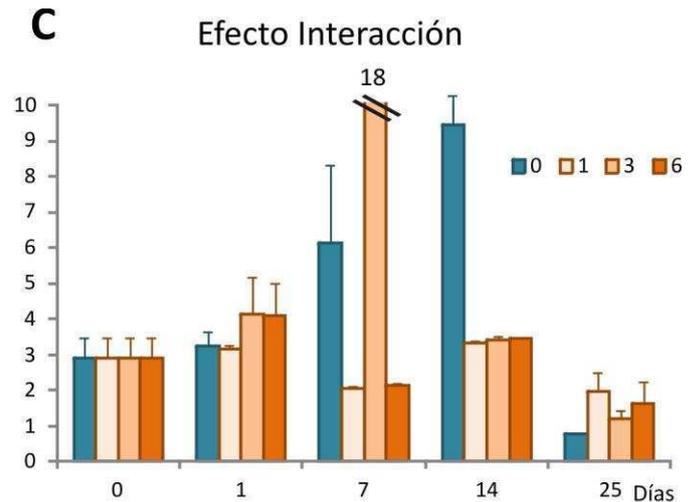
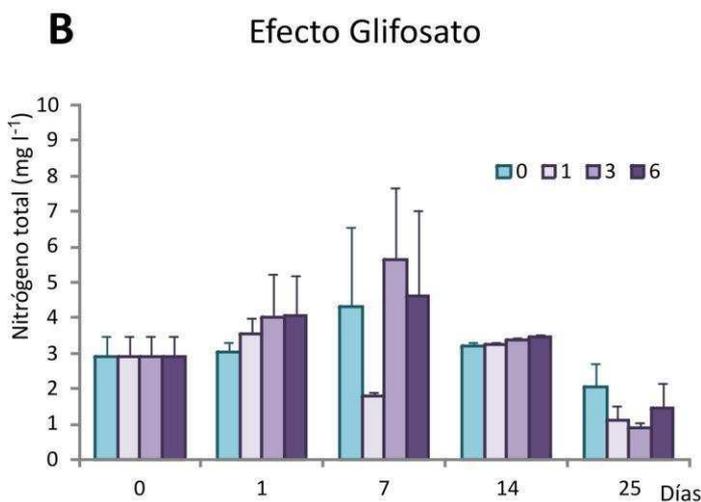


Figura 37 A: concentración media (+ 1 ES) de nitrógeno total (mg l^{-1}) en los tratamientos sin glifosato, con ausencia (- *L.f.*) y presencia (+ *L.f.*) de *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 37 B y C: concentración media (+ 1 ES) de nitrógeno total (mg l^{-1}) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental.

Al considerar el nitrógeno aportado por la molécula de glifosato para cada tratamiento, se observa que el herbicida estaría contribuyendo aproximadamente

entre el 2 y 13% del nitrógeno total en la columna de agua a las 24 hs. En la Tabla 7 se indica el porcentaje de aporte del nitrógeno proveniente del glifosato al nitrógeno total cuantificado a las 24 h para cada tratamiento. Si bien el porcentaje fue levemente menor en los tratamientos con mejillón respecto a los tratamientos sin mejillón, estas diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas.

<i>L. fortunei</i>	Glifosato inicial (mg l^{-1})		
	1	3	6
-L.f.	2,4 \pm 0,3 %	7,3 \pm 2,0 %	13,9 \pm 3,0 %
+L.f.	2,6 \pm 0,1 %	6,7 \pm 1,3 %	11,4 \pm 2,1 %

Tabla 7: porcentaje de aporte del glifosato (\pm ES) al nitrógeno total cuantificado al día 1 para los tratamientos con una adición de glifosato de 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} , sin (-L.f.) y con (+L.f.) *Limnoperna fortunei*.

Resumen: Nitrógeno total

- Efecto *L. fortunei*: en presencia de mejillón, el NT aumentó significativamente durante la segunda semana.
- Efecto Glifosato: no se observó efecto.
- Efecto Interacción: el mejillón y el glifosato generaron un efecto sinérgico sobre el NT para el tratamiento con la dosis media de glifosato (**3+Lf**), en donde se registró un significativo aumento (superior a la suma de los efectos por cada factor por separado) en los niveles de NT durante la primera semana experimental.

(e.iii) Fósforo reactivo soluble (PRS)

La concentración inicial del PRS fue baja en todos los tratamientos, promediando $0,01 \pm 0,01 \text{ mg P-PO}_4 \text{ l}^{-1}$. Si bien se observó que el fósforo reactivo soluble no sufrió variación por ninguno de los agentes por separado, se vio en cambio modificado por la presencia conjunta del glifosato y *Limnoperna fortunei* (Fig. 38).

Efecto *L. fortunei*: en los tratamientos que no tuvieron adición de herbicida (**0-Lf** y **0+Lf**), el PRS se mantuvo invariable durante todo el período experimental, con valores entre $0,01$ y $0,02 \text{ mg P-PO}_4 \text{ l}^{-1}$ (Fig. 38 A).

Efecto Glifosato: en los tratamientos que evaluaron el efecto del herbicida la concentración de PRS no varió significativamente a lo largo del período experimental, con valores promedio siempre iguales o inferiores a $0,01 \text{ mg P-PO}_4 \text{ l}^{-1}$ (Fig. 38 B).

Efecto Interacción: en los microcosmos con ambos agente interactuando, la concentración de PRS en agua varió en el tiempo de acuerdo a la concentración inicial de glifosato utilizada para cada tratamiento (Fig. 38 C). Los máximos valores de PRS fueron registrados a la semana, con promedios de: $0,03 \pm 0,01$; $0,06 \pm 0,01$ y $0,18 \pm 0,01$ mg P-PO₄ l⁻¹ para **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente ($p < 0,05$ para **3+Lf** y **6+Lf** entre sí y respecto a los demás tratamientos). Durante las dos semanas siguientes, el PRS fue gradualmente descendiendo hasta valores finales de $0,01 \pm 0,01$; $0,02 \pm 0,01$ y de $0,06 \pm 0,01$ mg P-PO₄ l⁻¹ para **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente.

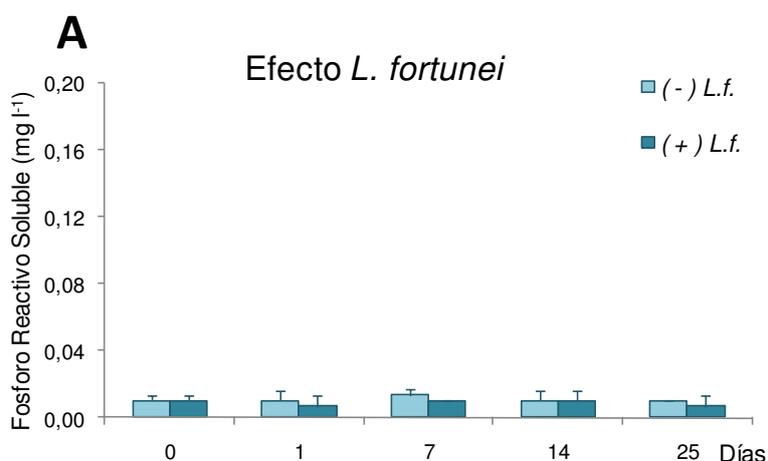
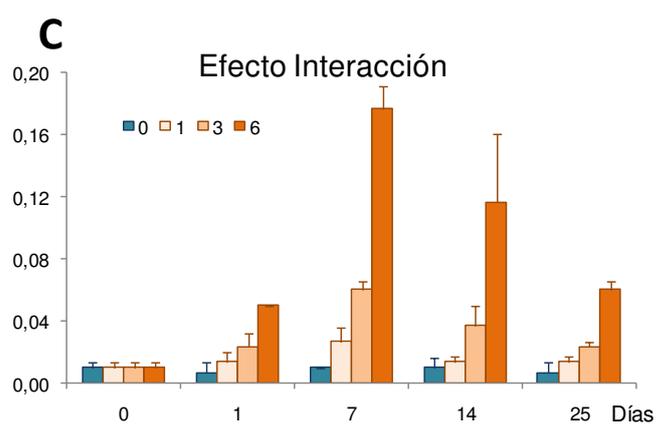
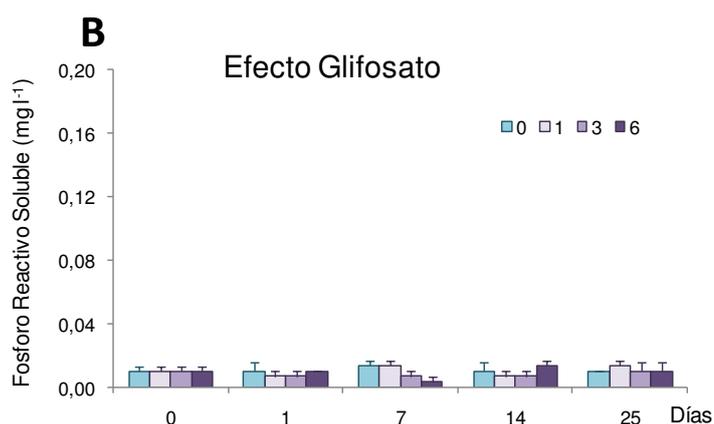


Figura 38 A: concentración media (+ 1 ES) de fósforo reactivo soluble como P-PO₄³⁻ (mg l⁻¹) en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 38 B y C: concentración media (+ 1 ES) de fósforo reactivo soluble como P-PO₄³⁻ (mg l⁻¹) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental.

Como fuera aplicado para la variable de fósforo total, con el fósforo reactivo soluble también se calcularon regresiones lineales simples entre el PRS en agua y la concentración de glifosato inicial para cada fecha de muestreo (excepto tiempo inicial)

en los tratamientos que evaluaron la interacción glifosato x *Limnoperna fortunei* (Fig. 38 C). Si bien las pendientes resultaron ser considerablemente menores que en PT, todas las regresiones fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$) (Tabla 8) indicando que la dosis suministrada de glifosato en los tratamientos está relacionada con el PRS cuantificado en cada día de muestreo.

Regresión Lineal Simple	Ecuación	Significancia de Regresión	Coefficiente de determinación (R^2)
Efecto Interacción Día 1	$y = 0,007x + 0,005$	$p < 0,01$	0,753
Efecto Interacción Día 7	$y = 0,028x + 0,001$	$p < 0,01$	0,921
Efecto Interacción Día 14	$y = 0,018x + 0,001$	$p < 0,01$	0,593
Efecto Interacción Día 25	$y = 0,009x + 0,003$	$p < 0,01$	0,859

Tabla 8: resultado de las regresiones lineales simples realizadas para cada día de muestreo entre la concentración inicial de herbicida (variable independiente) y el PRS (variable dependiente), en los tratamientos que evaluaron el Efecto Interacción.

Resumen: Fósforo reactivo soluble

- Efecto *L. fortunei*: no se detectó efecto.
- Efecto Glifosato: no se observó efecto.
- Efecto Interacción: el mejillón y el glifosato actuaron sinérgicamente sobre el PRS que presentó incrementos significativos durante la primera semana en las concentraciones medias y altas de glifosato (**3+Lf y 6+Lf**), que luego fueron gradualmente disminuyendo durante el resto del período experimental.

(e.iv) Amonio

Al momento de comenzar el experimento, la concentración del nitrógeno del amonio en los tanques fue inferior al límite de detección del método empleado para su dosaje.

Efecto *L. fortunei*: el mejillón generó un aumento en la concentración de $N-NH_4^+$ en la columna de agua a las 24 h alcanzando un valor promedio de $0,013 \pm 0,009$ mg $N-NH_4^+$ l⁻¹ respecto a la concentración registrada con ausencia de *L. fortunei*, de $0,003 \pm 0,009$ mg $N-NH_4^+$ l⁻¹. Posteriormente, en los días 7 y 14 no se registró amonio en ningún microcosmos. Recién a tiempo final se cuantificaron concentraciones bajas en ambos

tratamientos, con promedios de $0,007 \pm 0,007$ y de $0,007 \pm 0,003$ mg N- NH_4^+ l⁻¹ para **0-Lf** y **0+Lf** respectivamente (Fig. 39 A).

Efecto Glifosato: en los tratamientos con herbicida solo se registró nitrógeno amoniacal en el agua a las 24 h (con excepción en **6-Lf**) y a tiempo final, con concentraciones muy bajas, siempre menores a $0,01$ mg l⁻¹ (Fig. 39 B). No hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Efecto Interacción: nuevamente se cuantificó nitrógeno amoniacal en el agua solo a las 24 h y a tiempo final, pero aquí las concentraciones fueron mayores al día 1, alcanzando valores de hasta $0,05$ mg l⁻¹, con valores que promediaron $0,03 \pm 0,01$ mg N- NH_4^+ l⁻¹ en el tratamiento **1+Lf**, y $0,05 \pm 0,01$ mg l⁻¹ en **3+Lf** y **6+Lf** (Fig. 39 C) sin ser estadísticamente significativas las diferencias entre los tratamientos. A tiempo final la concentración del nitrógeno amoniacal fue menor, semejante a la cuantificada para el mismo tiempo en los tratamientos que evaluaron el efecto glifosato, con valores de $0,01 \pm 0,01$ mg l⁻¹ para todos los microcosmos.

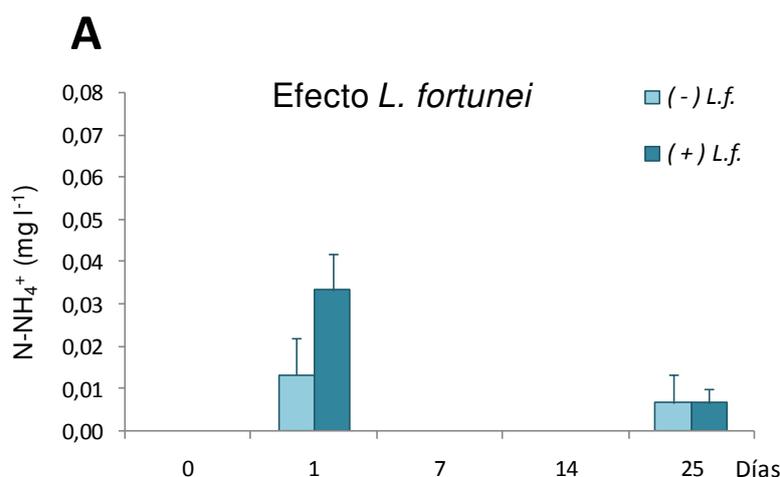
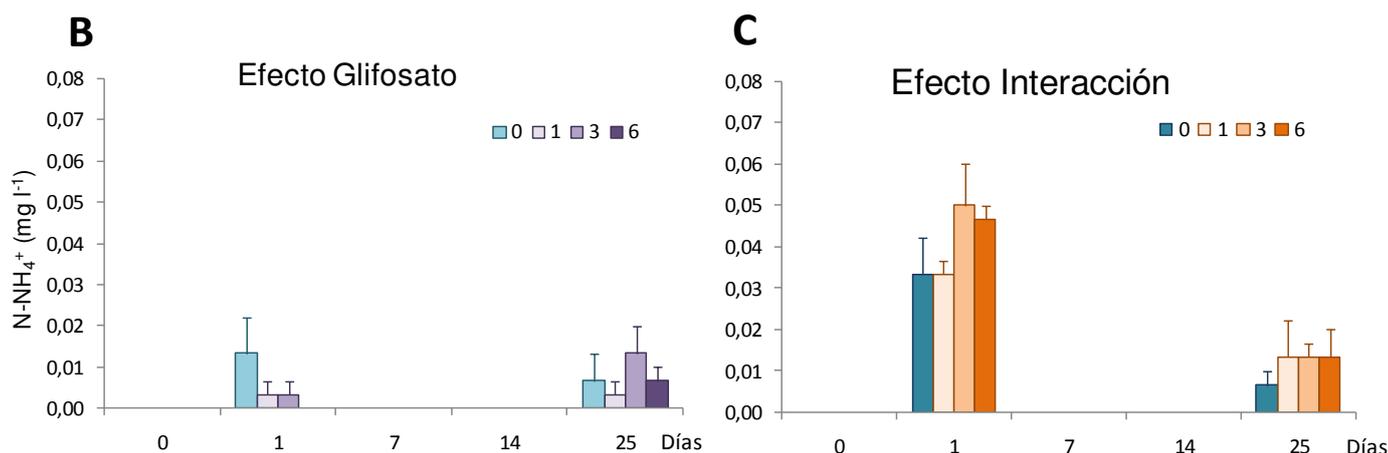


Figura 39 A concentración media (+ 1 ES) de amonio como N- NH_4^+ (mg l⁻¹) en los tratamientos sin glifosato, sin (- L.f.) y con (+ L.f.) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 39 B y C: concentración media (+ 1 ES) de fósforo reactivo soluble como $N-NH_4^+$ ($mg\ l^{-1}$) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 $mg\ l^{-1}$ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental.

Resumen: Amonio

- Efecto *L. fortunei*: el mejillón generó un aumento significativo del amonio en agua durante las primeras 24 h.
- Efecto Glifosato: no se observó efecto.
- Efecto Interacción: el comportamiento de la variable fue semejante al observado para el efecto del mejillón.

(e.v) Nitratos + Nitritos

El nitrógeno de los nitratos más los nitritos no fue detectable a tiempo inicial en los tanques y estuvieron ausentes durante casi todo el período experimental, lo que indica que fueron limitantes en la columna de agua.

Efecto *L. fortunei*: se encontró nitrógeno del nitrato + nitritos solo al día 1, siendo levemente mayor en presencia de mejillón con promedios (\pm ES) de $0,003 \pm 0,003$ y $0,013 \pm 0,003\ mg\ N-(NO_2^- + NO_3^-)\ l^{-1}$ en **0-Lf** y **0+Lf** respectivamente. Posteriormente el nitrógeno del nitrato + nitritos resultó no detectable mediante el método de cuantificación utilizado para las demás fechas de muestreo.

Efecto Glifosato: en los tratamientos que evaluaron el efecto del herbicida sobre nitratos + nitritos (**1-Lf**, **3-Lf** y **6-Lf**) no se los detectó durante todo el período experimental.

Efecto Interacción: todos los tratamientos con ambos agentes presentaron nitratos + nitritos solamente al día 1 del experimento, con valores promedio (\pm ES) de $0,010 \pm 0$; $0,013 \pm 0,003$ y $0,02 \pm 0,006$ mg N-(NO₂⁻+NO₃⁻) l⁻¹ en **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente. Posteriormente dichos nutrientes resultaron no detectables para las demás fechas de muestreo.

Resumen: Nitrato + Nitrito

- Efecto *L. fortunei*: en presencia del mejillón se observó un leve (pero no significativo) aumento del nitrato+nitrito en agua al día 1, y posteriormente estos valores descendieron a valores no detectables.
- Efecto Glifosato: no se observó efecto.
- Efecto Interacción: no hubo interacción.

f) Seston

Los valores iniciales de sólidos en suspensión estimadores del seston resultaron bajos, con concentraciones entre 0,3 y 0,4 mg l⁻¹ (Fig. 40). El seston presentó alta variabilidad entre réplicas durante todo el período de estudio.

Efecto *L. fortunei*: con presencia de *L. fortunei* el seston fue bajo durante todo el experimento, mientras que en ausencia de mejillón (**0-Lf**) se observó un aumento pronunciado y estadísticamente significativo ($p < 0,01$) a la semana, alcanzando valores de $8,00 \pm 2,00$ mg l⁻¹, para luego decrecer en las semanas siguientes (Fig. 40 A).

Efecto Glifosato: en el tratamiento con 1 mg l⁻¹ de glifosato (**1-Lf**) el seston se incrementó durante las primeras 24 h alcanzando valores de $2,00 \pm 1,15$ mg l⁻¹ sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. Los tratamientos con 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato (**3-Lf** y **6-Lf**) mostraron leves aumentos ($p > 0,05$) en los sólidos en suspensión recién a tiempo final (Fig. 40 B).

Efecto Interacción: en los tratamientos que evaluaron la interacción (Fig. 40 C) se observó un marcado aumento en el seston a partir de la segunda semana experimental para los tratamientos con 1 y 3 mg l⁻¹ de glifosato (**1+Lf** y **3+Lf**), siendo significativamente mayores de aquéllos sin mejillón ($p < 0,05$) solo a tiempo final, con valores que promediaron $4,67 \pm 1,45$ mg l⁻¹ y $4,00 \pm 1,15$ mg l⁻¹ para **1+Lf** y **3+Lf** respectivamente.

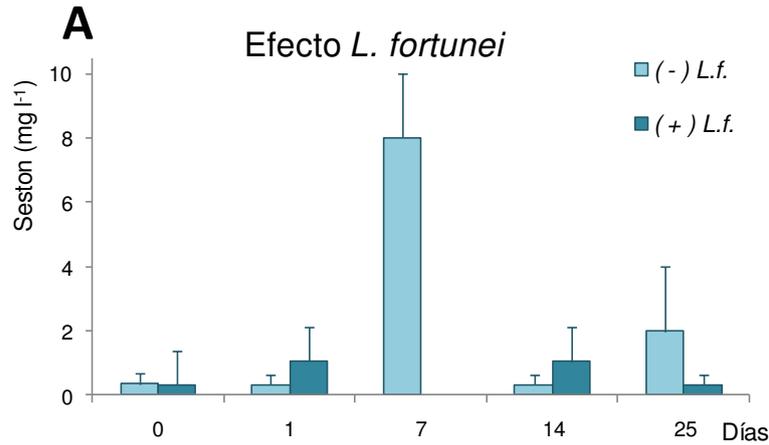
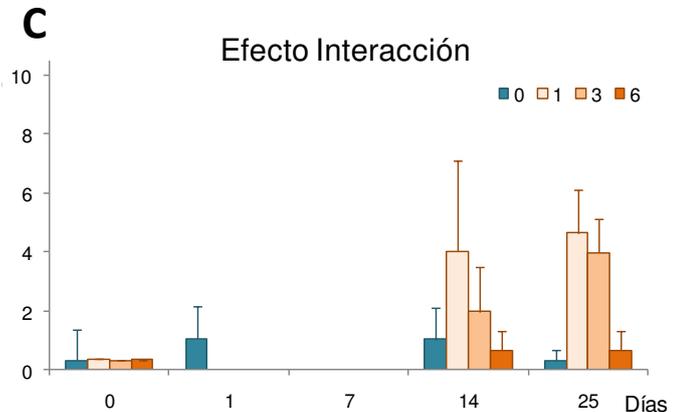
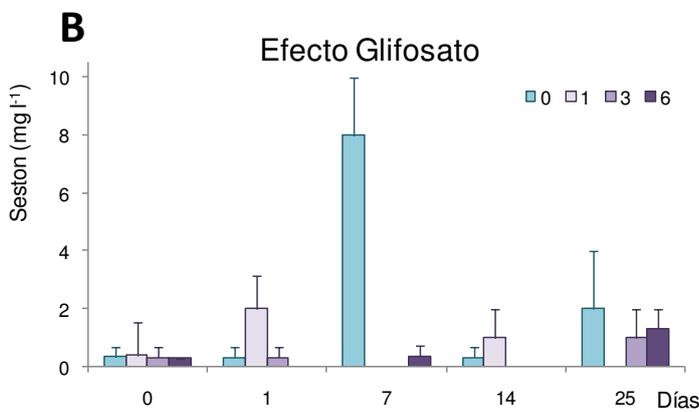


Figura 40 A: concentración media (+ 1 ES) de sólidos en suspensión (mg l⁻¹) en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L. f.*) y con (+ *L. f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 40 B y C: concentración media (+ 1 ES) de sólidos en suspensión (mg l⁻¹) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental.

Resumen: Seston

- Efecto *L. fortunei*: en ausencia de mejillón, el seston aumentó significativamente durante la primera semana respecto al tratamiento con mejillón, y luego no se vio una variación significativa en la concentración del seston a lo largo del período experimental.
- Efecto Glifosato: no se observó efecto.
- Efecto Interacción: a partir de la segunda semana hubo un aumento en el seston en los microcosmos con la dosis baja y media de glifosato (1+Lf y 3+Lf), siendo este significativamente mayor que los demás tratamientos recién a tiempo final.

g) Turbidez

La turbidez del agua presentó una gran variación entre tratamientos asociada principalmente a la presencia del mejillón (Fig. 41).

Efecto *L. fortunei*: durante las primeras 24 h la turbidez fue significativamente menor en presencia de mejillón ($p < 0,01$) (**0+Lf**) (Fig. 41 A). A la semana, la turbidez resultó similar entre los dos tratamientos, y a partir de la segunda semana el tratamiento con mejillón (**0+Lf**) comenzó a enturbiarse hasta el final del experimento, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas.

Efecto Glifosato: a las 24 hs de comenzado el experimento la turbidez fue máxima, con valores promedio entre 2 y 3 NTU (Fig. 41 B). A lo largo del experimento para todas las concentraciones de glifosato, la turbidez fue decreciendo hasta valores de 1 NTU al día 25. No hubo diferencias estadísticamente significativas dadas por el factor glifosato.

Efecto Interacción: en todos los tratamientos que evaluaron el efecto de la interacción se observó un valor de turbidez de $1,0 \pm 0,5$ NTU al día 1, siendo significativamente menor ($p < 0,05$) que aquélla registrada en los microcosmos que evaluaron el efecto glifosato (Fig. 41 C). A partir de la segunda semana la turbidez comenzó a aumentar alcanzando valores máximos de 3 NTU, siendo significativamente más turbios ($p < 0,05$) que los tratamientos sin mejillón (**0-Lf**, **1-Lf**, **3-L.f**, **6-Lf**).

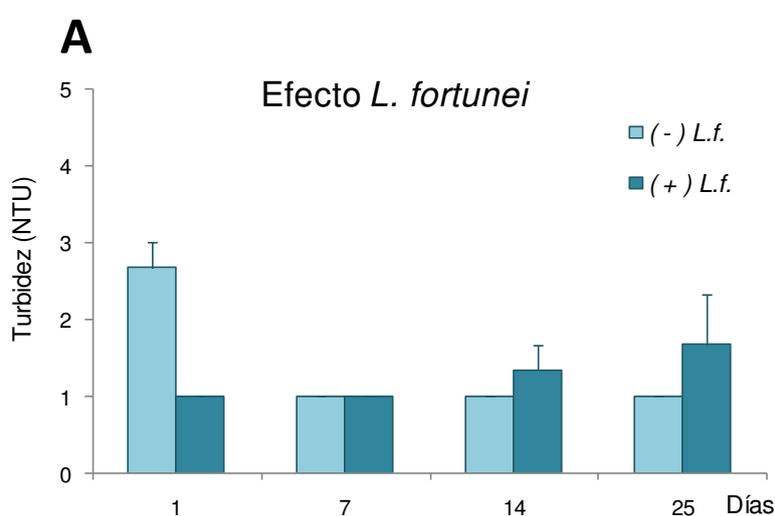
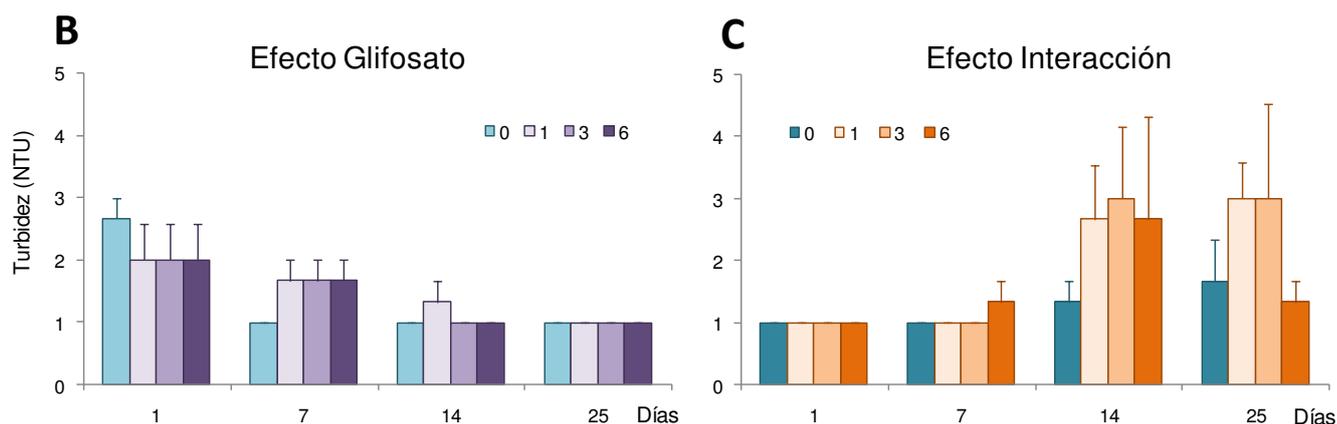


Figura 41 A: concentración media (+ 1 ES) de turbidez (NTU) en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 41 B y C: concentración media (+ 1 ES) de turbidez (NTU) para los distintos tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.

Resumen: Turbidez

- Efecto *L. fortunei*: en presencia de mejillón, la turbidez fue significativamente menor durante las primeras 24 h, Luego la turbidez aumentó en presencia de *L. fortunei* hasta alcanzar valores mayores que en ausencia de mejillón (pero no significativos) a la segunda y tercera semana experimental.
- Efecto glifosato: no se observó efecto glifosato.
- Efecto conjunto: la presencia del mejillón y el glifosato estarían actuando sinérgicamente aumentando significativamente la turbidez del agua a partir de la segunda semana en presencia de ambos agentes.

iii) Variables biológicas

Con el objeto de relativizar los valores de las variables biológicas en la columna de agua (bacterioplancton, fitoplancton y zooplancton) a las diferencias en la cantidad de mejillones presentes en cada microcosmos, cada variable fue multiplicada por un factor de corrección que fue calculado para cada microcosmos (X) con la siguiente ecuación: número de mejillones en microcosmos X/promedio total del número de mejillones en los tratamientos con *L. fortunei* de todos los microcosmos. El promedio (\pm ES) del número de mejillones en los microcosmos fue de 350 ± 15 individuos. De esta manera, si un microcosmos presentó un mayor número de mejillones respecto al promedio general, se pesó positivamente a las variables biológicas de la columna de agua con un factor de corrección >1 ya que el número de microorganismos contados en la columna de agua hubiera sido mayor si el número de mejillones filtrando hubiera sido menor.

Contrariamente, si el número de mejillones en un tratamiento fuera menor al promedio de los tratamientos con mejillón, se multiplicó por un factor <1 . Los factores de corrección calculados variaron entre 0,9 y 1,1.

a) Bacterioplancton

Al comenzar el experimento el número de bacterias totales en la columna de agua osciló entre 1 y 3 millones ml^{-1} , siendo altamente variable entre el agua de los tres tanques de acuicultura (valores de $1,02 \times 10^6$, $1,59 \times 10^6$ y $3,14 \times 10^6$). Para reducir dicha variabilidad y analizar los cambios, se relativizaron los recuentos de bacterioplancton de cada microcosmos al valor inicial, restándole al número total de bacterias en cada tiempo de muestreo, el valor inicial obtenido para cada tanque. Las bacterias totales aumentaron a partir de la primera semana y a lo largo del período experimental en todos los tratamientos.

Efecto *L. fortunei*: si bien el número de bacterias fue superior durante la primera y segunda semana del experimento en presencia de *L. fortunei*, estas diferencias no fueron significativas, y ambos tratamientos siguieron un comportamiento similar a lo largo del tiempo (Fig. 42 A), alcanzando un promedio a tiempo final entre 5,5 y 6 millones de bacterias por ml.

Efecto Glifosato: en los tratamientos que evaluaron el efecto glifosato (Fig. 42 B), se observó que las bacterias aumentaron en número durante la primera semana ($p < 0,01$) a valores promedio entre 2,6 y 4,2 millones bacterias ml^{-1} y luego se mantuvieron relativamente constantes hasta el tiempo final, sin presentar diferencias estadísticas entre dichos tratamientos.

Efecto Interacción: en los tratamientos con *Limnoperna fortunei* y glifosato (Fig. 42 C), el aumento de las bacterias durante la primera semana fue más pronunciado ($p < 0,01$) siendo mayor en tratamientos con glifosato respecto al control ($p < 0,05$), con valores promedio de $4,6 \pm 1,5$ millones de bacterias por ml^{-1} para el tratamiento **0+Lf**; y de $6,8 \pm 2,0$ millones; $7,8 \pm 1,2$ millones y $8,5 \pm 1,4$ millones de bacterias por ml^{-1} para **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente. Durante la última semana del experimento el número de bacterias aumentó en los tratamientos con dosis baja y media de glifosato (**1+Lf** y **3+Lf**) hasta promedios cercanos a 12 millones ml^{-1} , sin ser estadísticamente distinto de la

concentración de **6+Lf** (8 mill ml^{-1}). A tiempo final todos los tratamientos con interacción resultaron ser significativamente mayor que en los tratamientos que evaluaron el efecto glifosato (**1-Lf, 3-Lf y 6-Lf**).

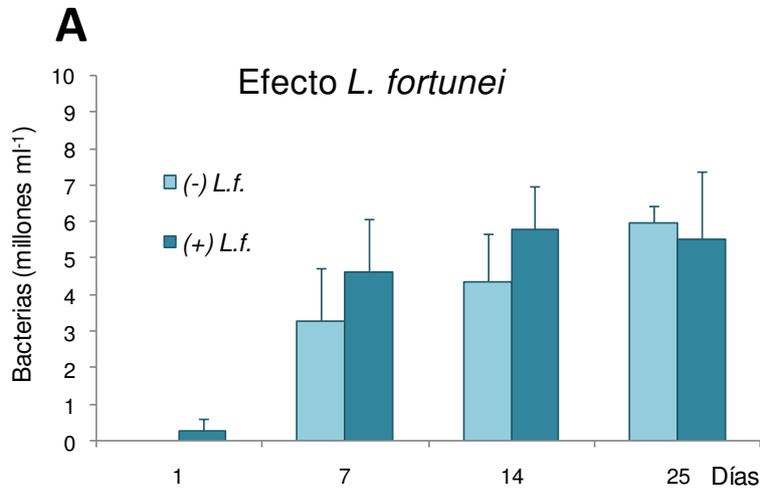
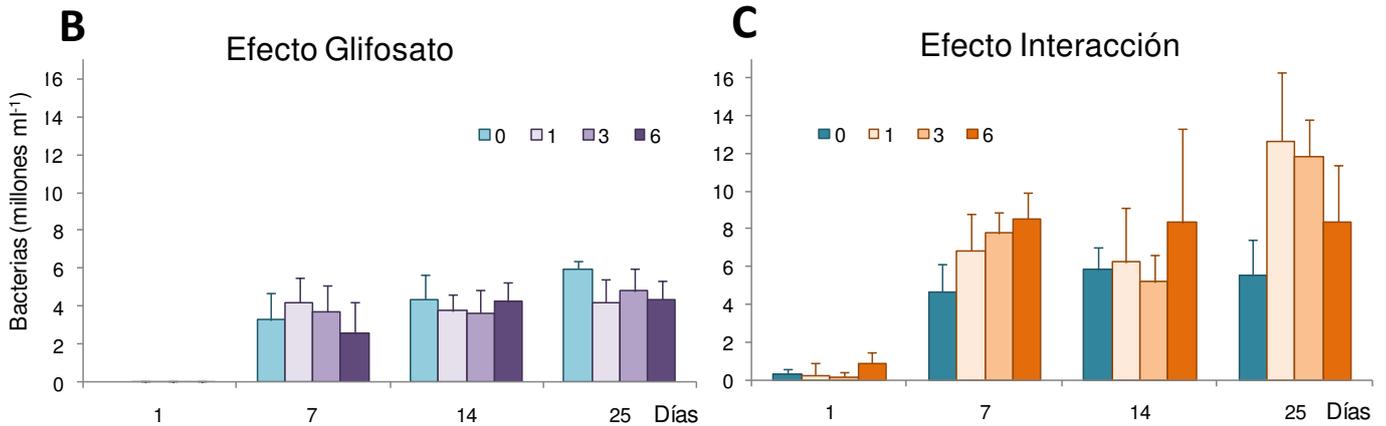


Figura 42 A: concentración media (+ 1 ES) del número de bacterias totales (en millones por ml) relativizadas al tiempo inicial, para los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 42 B y C: concentración media (+ 1 ES) del número de bacterias totales (en millones por ml) relativizadas al tiempo inicial para los distintos tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.

Resumen: Bacterioplancton

- Efecto *L. fortunei*: en presencia del mejillón se vería estimulado el aumento en la abundancia del bacterioplancton, aunque no de manera significativa.
- Efecto Glifosato: no se observaron diferencias entre tratamientos.
- Efecto Interacción: el glifosato y el mejillón tuvieron un efecto sinérgico sobre el número de bacterias en la columna de agua que se vio potenciado hacia tiempo final, en particular para las concentraciones de 1 y 3 mg l^{-1} .

b) Fitoplancton*(b.i) Clorofila-a*

La concentración de clorofila-*a* fitoplanctónica (Chl-*a*) se vio afectada tanto por la presencia de *Limnoperna fortunei*, como por la incorporación de herbicida en los microcosmos (Fig. 43). En todos los tratamientos, los valores iniciales de Chl-*a* promediaron $5,1 \pm 1,0 \mu\text{g l}^{-1}$.

Efecto *L. fortunei*: en presencia de *L. fortunei*, la Chl-*a* sufrió una rápida disminución ($p < 0,05$) durante las primeras 24 h para luego recuperarse a la semana y continuar en aumento hasta triplicarse al día 14 (con un promedio de $15,2 \pm 0,9 \mu\text{g l}^{-1}$) que resultó estadísticamente mayor ($p < 0,05$) a los valores de Chl-*a* sin mejillón (Fig. 43 A). Durante la última semana la Chl-*a* en presencia de *L. fortunei* volvió a disminuir hasta valores similares a los iniciales, promediando $6,9 \pm 4,8 \mu\text{g l}^{-1}$. En ausencia de mejillón, en cambio, la concentración de Chl-*a* fitoplanctónica fue gradualmente disminuyendo a lo largo del período experimental.

Efecto Glifosato: En aquellos microcosmos que evaluaron el efecto del herbicida (Fig. 43 B), la Chl-*a* fue disminuyendo gradualmente a lo largo del período experimental a valores de entre $1,1-2,5 \mu\text{g l}^{-1}$, con excepción del tratamiento **3-Lf** en donde la Chl-*a* se mantuvo estable con valores entre 4 y $5,5 \mu\text{g l}^{-1}$. No obstante, no hubo diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos.

Efecto Interacción: se registró una disminución inicial de la Chl-*a* durante las primeras 24 h experimentales, que luego se recuperó durante la primera semana a valores semejantes a los iniciales, y continuó aumentando para alcanzar los valores máximos al día 14 (excepto para **1+Lf**), con promedios de $19,6 \pm 4,4 \mu\text{g l}^{-1}$; $12,3 \pm 5,1 \mu\text{g l}^{-1}$ y $7,6 \pm 3,6 \mu\text{g l}^{-1}$ para los tratamientos **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente (Fig. 43 C). Para el tratamiento **1+Lf**, sin embargo, la Chl-*a* continuó aumentando durante la última semana del experimento hasta alcanzar un valor promedio de $36,0 \pm 6,6 \mu\text{g l}^{-1}$ que resultó significativamente mayor ($p < 0,01$) a los valores de Chl-*a* cuantificados en los demás tratamientos.

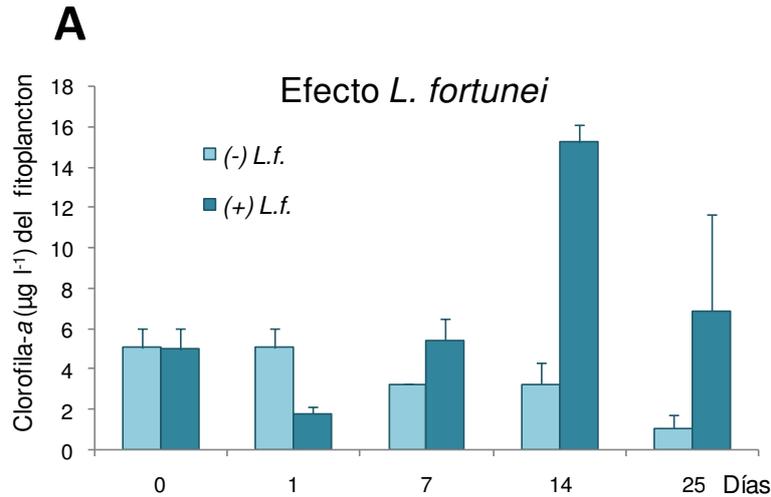
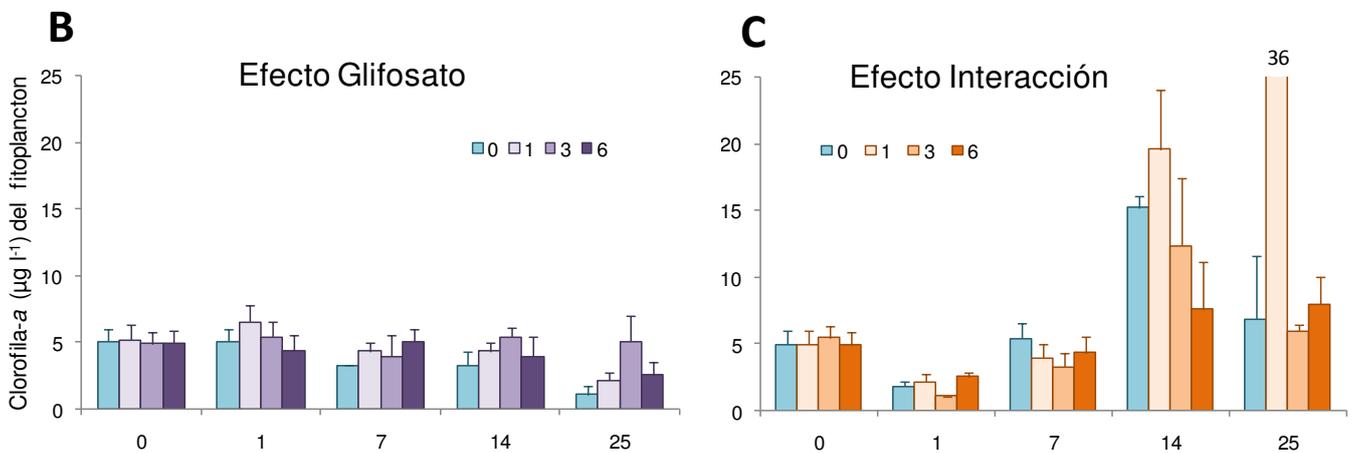


Figura 43 A: concentración media (+ 1 ES) de clorofila-a del fitoplancton (μl^{-1}) en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 43 B y C: concentración media (+ 1 ES) de clorofila-a del fitoplancton (μl^{-1}) en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.

Resumen: Fitoplancton (clorofila-a)

- Efecto *L. fortunei*: la presencia de mejillón generó una disminución inicial (día 1) y un aumento posterior (día 14) en la clorofila-a fitoplanctónica.
- Efecto Glifosato: el herbicida no afectó significativamente la clorofila-a.
- Efecto Interacción: se detectó un alto crecimiento de la clorofila-a para la dosis más baja de glifosato (1+Lf) a tiempo final.

(b.ii) Recuentos: algas totales por ml

Dentro de la comunidad del fitoplancton, las fracciones de las picoeucariota y las picocianobacterias estuvieron ausentes en casi todas las muestras. Al comenzar el experimento, la abundancia de algas totales (micro + nanoplancton) fue en promedio

(\pm ES), de $18,6 \times 10^3 \pm 3,7 \times 10^3$ algas ml^{-1} . En todos los tratamientos, la abundancia fitoplanctónica fue disminuyendo a lo largo del período experimental (Fig. 44).

Efecto *L.fortunei*: al día 1 ya se podía detectar a simple vista un aumento en la transparencia del agua en los microcosmos con presencia de mejillón (Figs. 45 y 46). Esto se vio reflejado en la abundancia del fitoplancton total, que con *L. fortunei* disminuyó abruptamente ($p < 0,05$) 93% de la abundancia inicial durante las primeras 24 h experimentales, siendo significativamente menor ($p < 0,05$) su concentración en presencia de mejillón respecto al tratamiento sin *L. fortunei* (**0-Lf**) a los días 1 y 7 (Fig. 44 A). Durante el resto del período experimental los microcosmos con mejillón presentaron una abundancia media de fitoplancton semejante e inferior a 5.000 algas ml^{-1} . En ausencia de mejillón en cambio, la concentración de fitoplancton fue gradualmente descendiendo en el tiempo, siendo este decaimiento estadísticamente significativo durante la primera semana ($p < 0,05$).

Efecto Glifosato: semejante a lo que se observó en **0-Lf**, el número de algas por ml totales en la columna de agua fue gradualmente decreciendo a lo largo del período experimental, para alcanzar en todos los tratamientos a tiempo final una abundancia menor a 5.000 algas ml^{-1} . Si bien no se registraron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de herbicida, se observa que la disminución en el número de algas a lo largo del tiempo en tratamientos con glifosato fue más lenta respecto del control (**0-Lf**) (Fig. 44 B).

Efecto Interacción: los tratamientos con ambos agentes se comportaron de la misma manera que lo observado para el efecto *L. fortunei*. Durante las primeras 24 h experimentales la abundancia fitoplanctónica decreció abruptamente entre un 90-92% en todos los tratamientos con mejillón, para luego mantenerse baja durante el resto del período experimental con abundancias promedio inferiores a 5.000 algas ml^{-1} (Fig. 44 C).

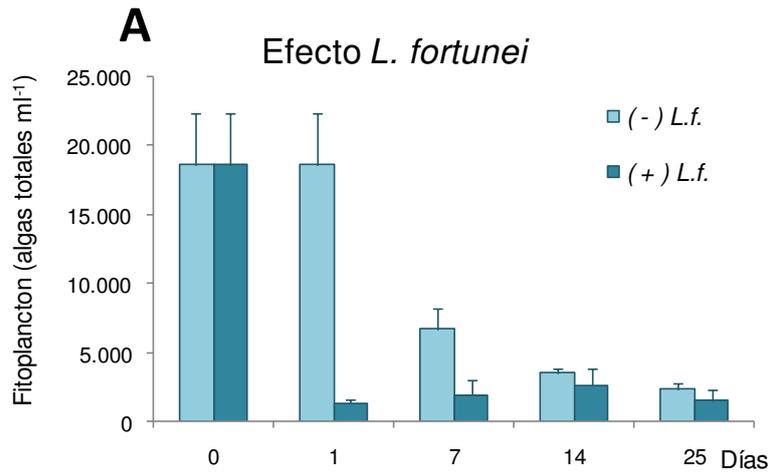
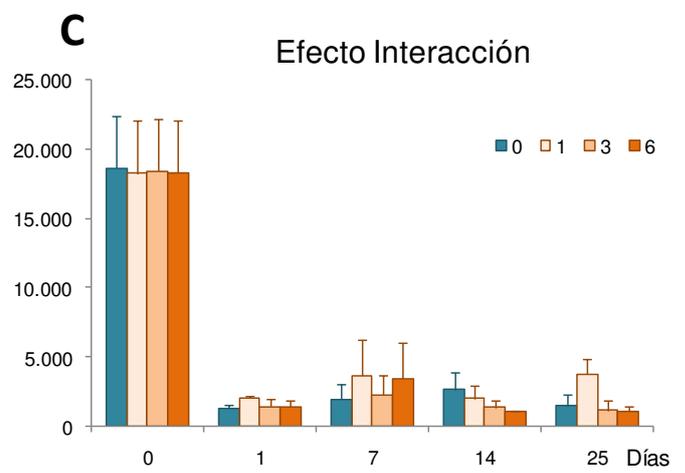
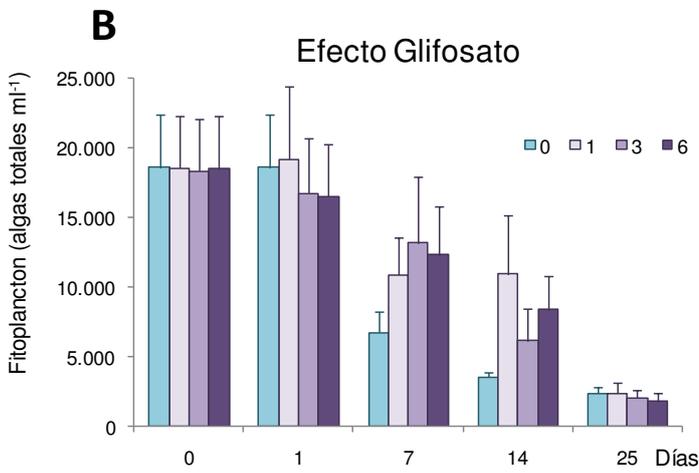


Figura 44 A: abundancia media (+ 1 ES) de algas totales de fitoplancton para los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei*, durante el periodo experimental.



Figuras 44 B y C: abundancia media (+ 1 ES) de algas totales de fitoplancton en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei* durante el periodo experimental.

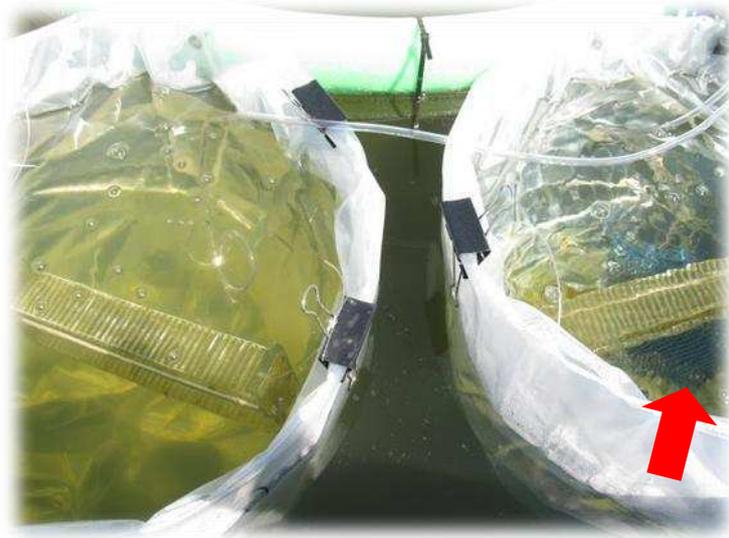
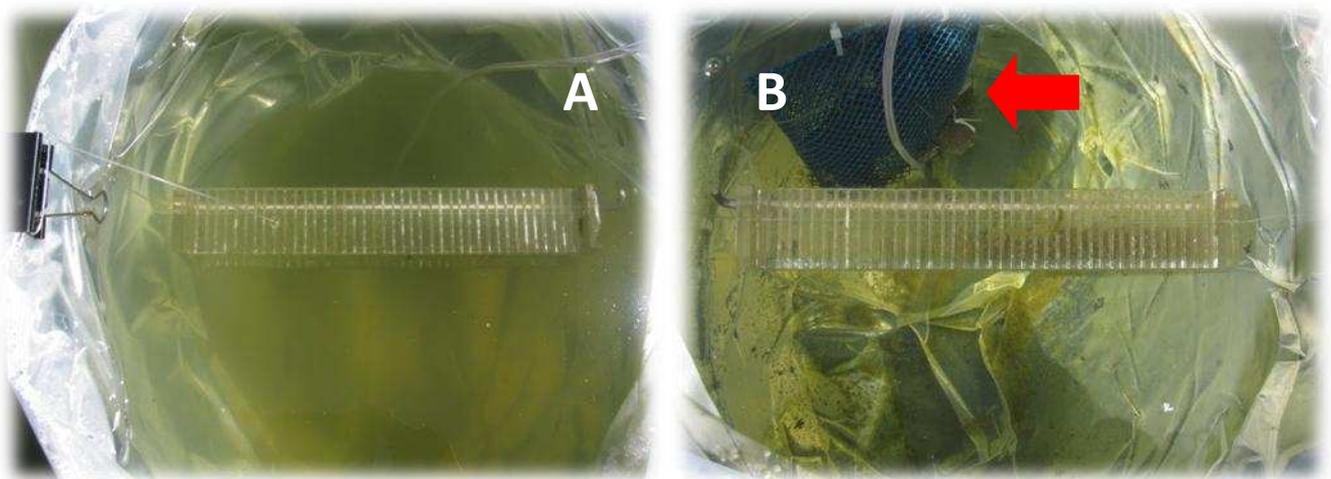


Figura 45: fotografía de dos microcosmos al día 1 del experimento donde se puede observar a ojo desnudo la mayor transparencia del agua en el microcosmos de la derecha, que contiene individuos de *Limnoperna fortunei* dentro de la jaula azul (flecha) respecto al microcosmos de la izquierda, sin mejillones.



Figuras 46 A y B: detalle de dos microcosmos al día 1 del experimento donde se puede observar una mayor transparencia del agua en el microcosmos (B) que contiene individuos de *Limnoperna fortunei* dentro de la jaula (flecha) respecto del microcosmos sin mejillones (A).

Resumen: fitoplancton (algas totales ml^{-1})

- Efecto *L. fortunei*: la presencia del mejillón generó una significativa disminución en el número de algas del fitoplancton en la columna de agua.
- Efecto Glifosato: la disminución en la abundancia del fitoplancton en el tiempo fue más lenta en tratamientos con glifosato respecto del tratamiento sin herbicida.
- Efecto Interacción: no se observó un claro efecto conjunto de ambos agentes sobre la abundancia fitoplanctónica.

(b.iii) Abundancia relativa de los grupos algales

Al considerar la abundancia relativa de los principales grupos algales del fitoplancton, se identificó a las clorofitas no-filamentosas como el grupo dominante en todos los tratamientos a lo largo del período experimental (Fig. 47-49). Si bien hubo variación entre tratamientos, el glifosato no generó diferencias estadísticas entre ellos, mientras que la presencia o ausencia de *L. fortunei* afectó el patrón de abundancia relativa. La Fig. 47 corresponde a la composición inicial del fitoplancton tomado del agua de los tres tanques de acuicultura al primer día, con el que posteriormente fueron llenados los microcosmos. Se puede observar que al comenzar el experimento el fitoplancton se encontraba dominado por clorofitas no-filamentosas que representaron el 88% de la abundancia total, seguido por el nanofitoplancton (aquí considerada como la fracción algal entre 2 y 5 μm) con aproximadamente 6% y las cianobacterias filamentosas con un 4%.

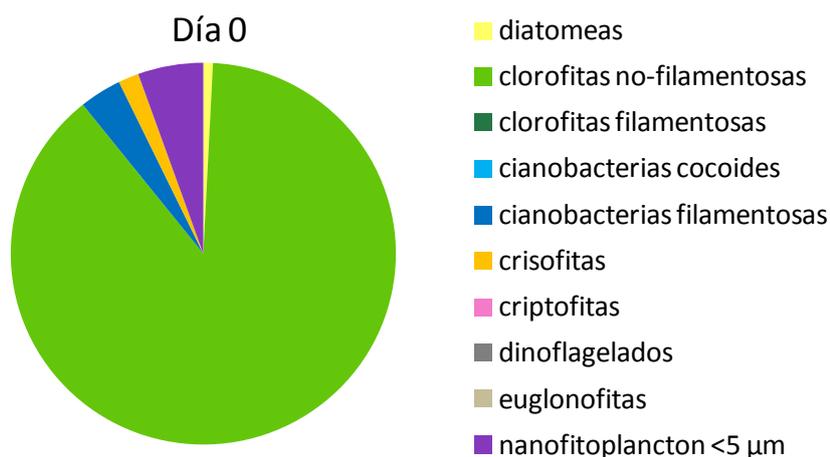


Figura 47: abundancia relativa de los principales grupos de fitoplancton encontrados en el experimento (clorofitas no-filamentosas, clorofitas filamentosas, cianobacterias cocoides, cianobacterias filamentosas, crisofitas, criptofitas, diatomeas, euglenofitas, dinoflagelados y nanoplancton <5 μm) a tiempo inicial.

Efecto *L. fortunei*: en los tratamientos sin mejillón (**0-Lf**) no se observó gran variación en el tiempo en la dominancia de los tres grupos más abundantes siendo estos las clorofitas no-filamentosas con una abundancia relativa siempre superior al 80%, el grupo de las crisofitas con una abundancia relativa que varió entre 4 y 12%, siendo máxima al día 14 y el nanofitoplancton con abundancias relativas entre 5-12% (Fig. 48). En los tratamientos con *L. fortunei* (**0+Lf**) en cambio, a las 24 h de comenzando el experimento se observa que la abundancia relativa de las clorofitas no-filamentosas

disminuyó respecto al tiempo inicial a 61%, a la vez que aumentó la densidad del nanofitoplancton (18%), crisofitas (11%) y las cianobacterias filamentosas (8%). Durante las primeras dos semanas volvió a aumentar la abundancia de las clorofitas no-filamentosas a valores entre 88-92% a expensas de los demás grupos algales que se vieron reducidos en sus abundancias relativas. A tiempo final las clorofitas no-filamentosas siguieron siendo dominantes con un 82% del total del fitoplancton, no obstante, aumentó el número de los principales grupos minoritarios siendo estos: clorofitas filamentosa (7%), criptofitas (5%), nanofitoplancton (3%) y cianobacterias filamentosas (2%).

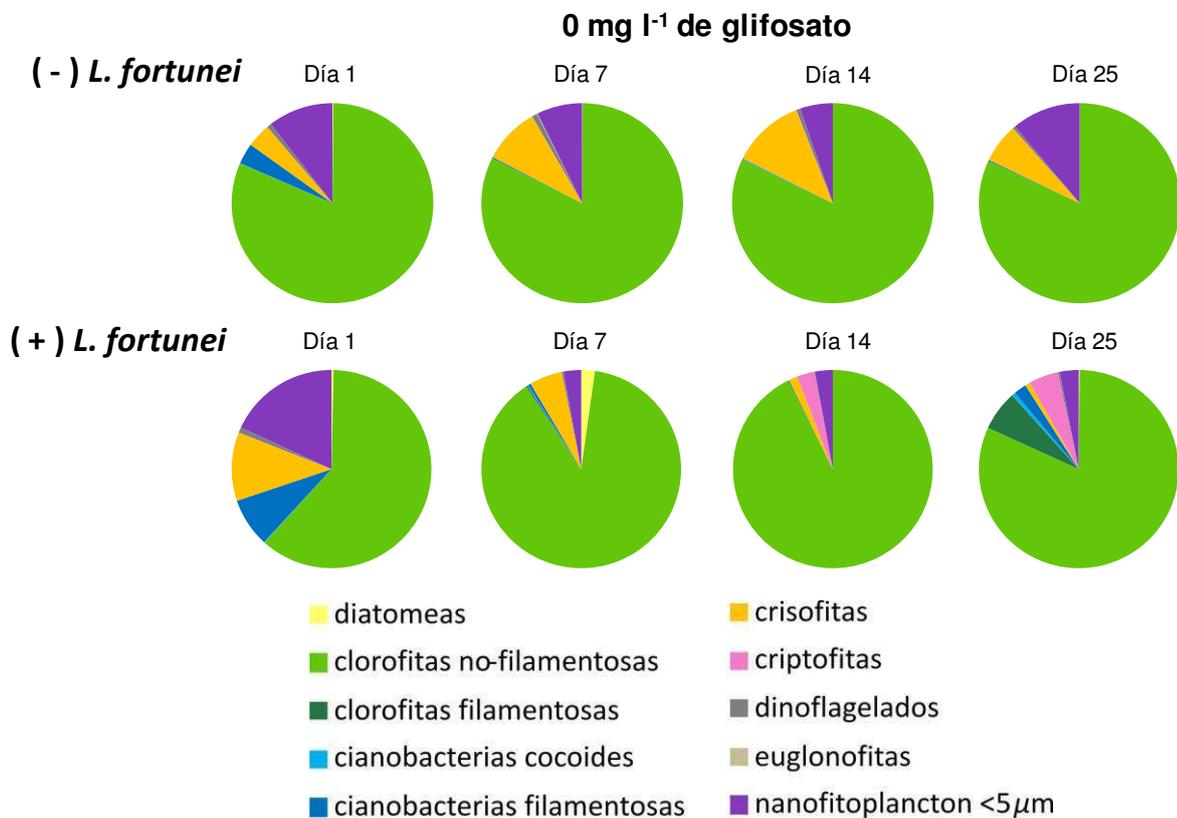


Figura 48: abundancia relativa (en porcentaje) de los principales grupos de fitoplancton a lo largo del período experimental, para los tratamientos sin herbicida, con ausencia y presencia de *Limnoperna fortunei*.

Efecto Glifosato: en los tratamientos que tuvieron adición de glifosato, el comportamiento de los principales grupos algales fue levemente distinto a aquél sin herbicida (Fig. 49). En ausencia de *L. fortunei*, durante las primeras 24 h, en todos los tratamientos con glifosato (**1-Lf**, **3-Lf** y **6-Lf**) las clorofitas no-filamentosas conservaron altas abundancia relativas en promedio entre 82-85%, el nanofitoplancton por su parte

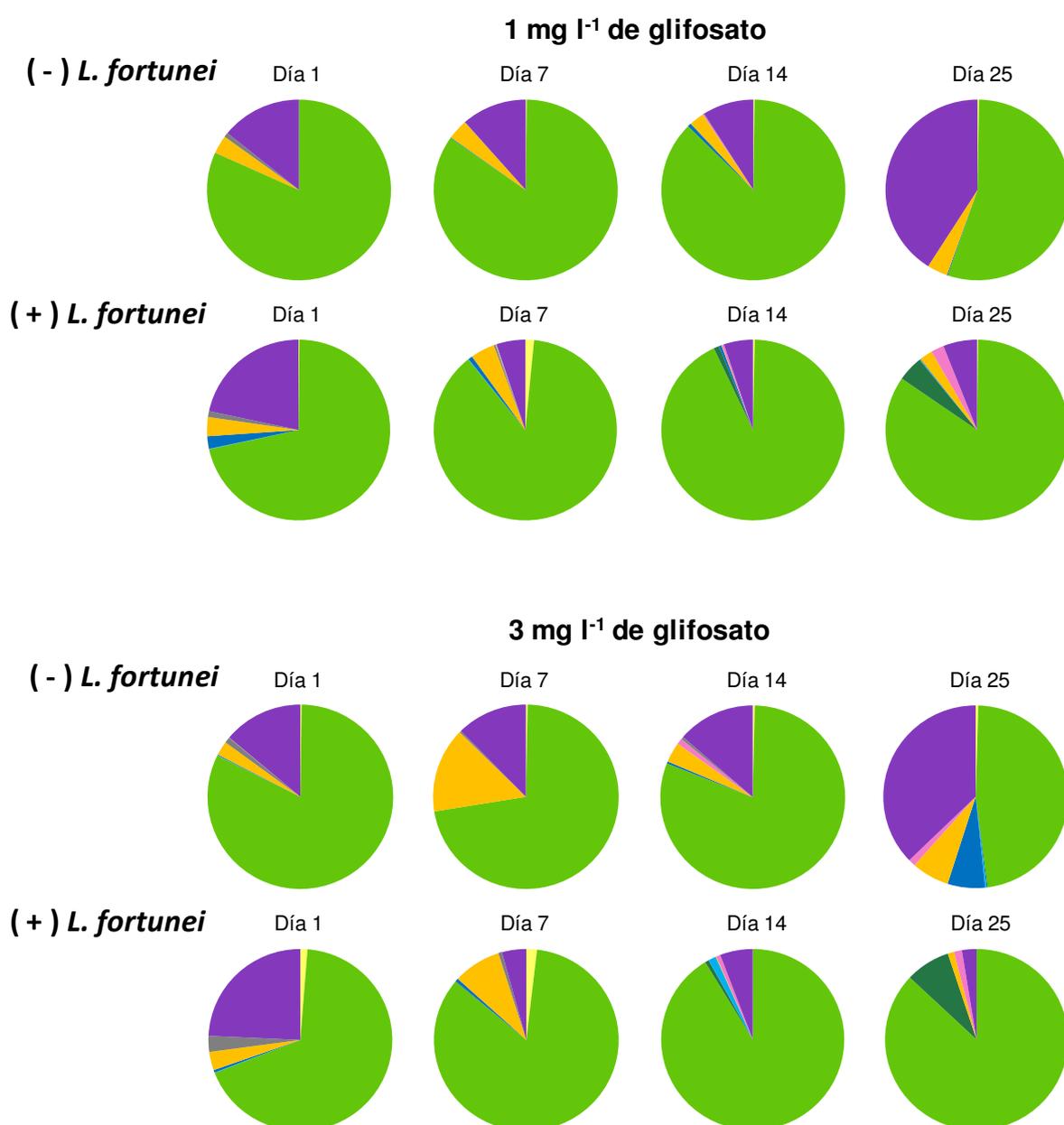
aumentó a valores entre 12-14%, las crisofitas tomaron valores de 2-3% y los dinoflagelados aumentaron respecto al tiempo inicial, con abundancia relativa promedio de aproximadamente 0,5-1% del total del fitoplancton.

En la concentración de 1 mg l⁻¹ de glifosato, estas abundancias relativas no se modificaron demasiado a lo largo del experimento hasta tiempo final cuando el nanofitoplancton aumentó significativamente ($p < 0,05$), tomando valores del 41% del fitoplancton total, a expensas de las clorofitas no-filamentosas que disminuyeron a un 55% de abundancia relativa. En los tratamientos con 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, en cambio, se observó que al día 7 aumentó la densidad de las crisofitas (a 14% y 15% respectivamente), volviendo a abundancias relativas semejantes a las del día 1 durante la segunda semana. A tiempo final hubo una disminución en la abundancia relativa de las clorofitas no-filamentosas, siendo mucho más drástica en el tratamiento **3-Lf**, hasta valores de 47% y 70% para las concentraciones de 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato respectivamente. En ambos tratamientos se identificó a tiempo final un aumento en la diversidad de grupos dominantes dentro de la minoría, siendo estos: nanofitoplancton (37% y 14%), crisofitas (7% y 10%), cianobacterias filamentosas (7% y 2%) y criptofitas (1% y 2%). En la concentración más alta de glifosato, además, se vio un aumento a tiempo final de las diatomeas, con una abundancia relativa de casi el 2%.

Efecto Interacción: en cuanto a los tratamientos que evaluaron el efecto conjunto del herbicida y *L. fortunei*, se pudo observar que durante las primeras 24 h, para todas las concentraciones de glifosato, el nanofitoplancton aumentó en promedio respecto al tiempo inicial ($p < 0,05$) a valores entre 22-24%, a expensas de las clorofitas no-filamentosas que disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) a una abundancia relativa de entre 68-71% (Fig. 49). Asimismo, aumentó levemente la densidad de las crisofitas a valores de entre 3-5% de la abundancia total, y apareció el grupo de los dinoflagelados que se encontraba ausente a tiempo inicial, con una abundancia relativa de entre 1-2%. A la semana, las clorofitas no-filamentosas volvieron a aumentar ($p < 0,05$) con una abundancia relativa superior al 87%, seguidas por las crisofitas (4-8%), el nanofitoplancton (4-5%), y diatomeas (1-2%). Al día 14 desapareció casi por completo el grupo de las crisofitas (0,1-0,5%), si bien a tiempo final volvió a aumentar la abundancia de este grupo con porcentajes relativos entre 1 y 2%. Asimismo, a tiempo final aparecieron nuevos grupos como las clorofitas filamentosas (3-8%) y la criptofitas

(1-2%) que se sumaron a los nanofitoplancton (3-20%) y las clorofitas no-filamentosas (73-87%) presentes en todos los tiempos anteriores.

Por último, se observaron diferencias significativas en la abundancia relativa de las clorofitas no-filamentosas entre los tratamientos con ausencia y presencia de *L. fortunei* para el día 1 ($p < 0,01$) en donde la abundancia fue menor en los tratamientos con mejillón respecto a los que carecían de este, y en los días 7 y 14 ($p < 0,05$) en donde la abundancia de las clorofitas no-filamentosas fue relativamente mayor en los tratamientos con mejillón respecto a los que tenían ausencia de *L. fortunei*.



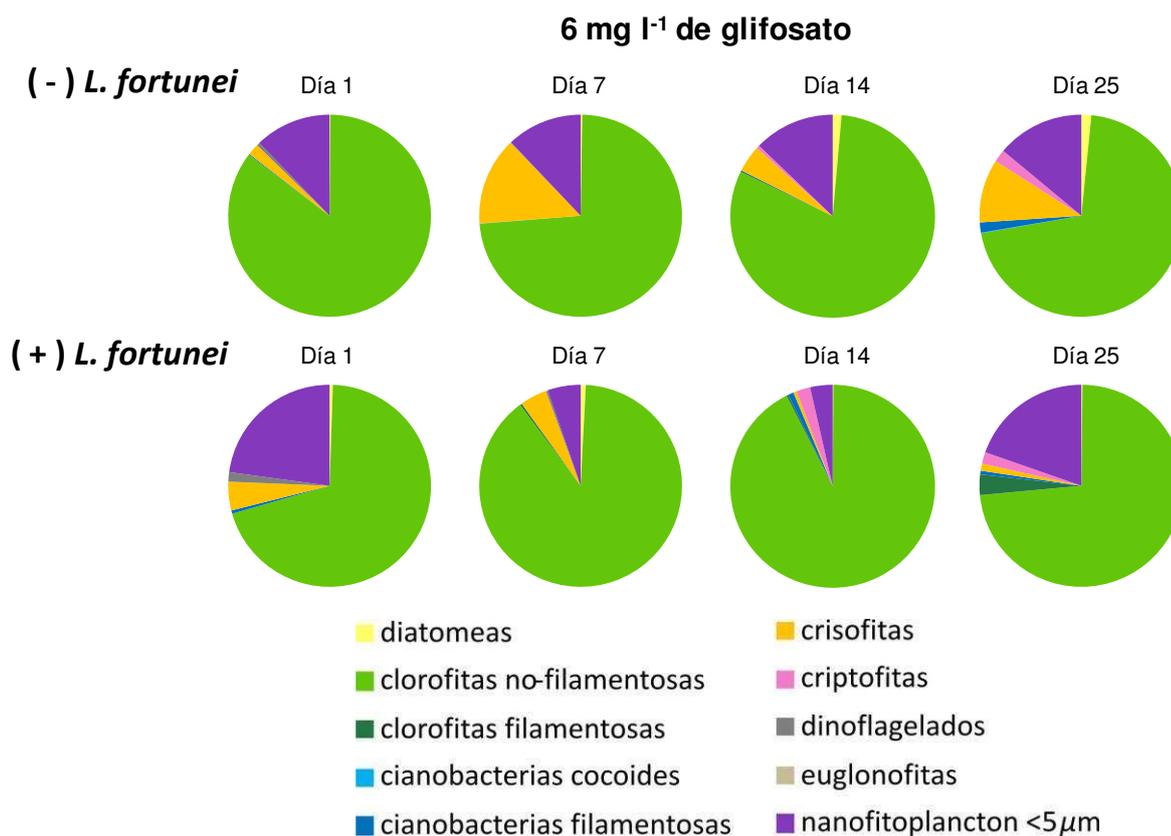


Figura 49: variación en la abundancia relativa de los principales grupos de fitoplancton, a lo largo del tiempo para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (-) y con (+) *Limnoperna fortunei*.

Resumen: Fitoplancton (abundancia relativa de grupos algales)

- Efecto *L. fortunei*: la presencia del mejillón generó diferencias significativas en las abundancias relativas de los distintos grupos algales, disminuyendo las clorofitas no-filamentosas al día 1, para luego recuperarse durante las dos semanas siguientes. A tiempo final, la cantidad de grupos de la comunidad de fitoplancton aumentó en presencia de mejillón.
- Efecto Glifosato: a tiempo final se observó un aumento (no significativo) en la abundancia relativa del nanofitoplancton <5 µm para las concentraciones de glifosato de 1 y 3 mg l⁻¹ que representó entre el 37-41% del total del fitoplancton.
- Efecto Interacción: no se observó con claridad un efecto conjunto de ambos agentes, siendo preponderante el efecto de *L. fortunei*.

(b.iv) Análisis de la composición de las clorofitas no-filamentosas

Si tenemos en cuenta los géneros y/o especies algales del fitoplancton que conforman a las denominadas clorofitas no-filamentosas, observamos que son varios

los grupos incluidos en esta categoría, siendo representados principalmente por: dos especies de *Staurastrum* (aquí serán identificadas como “sp.1” y “sp.3”) *Schroederia* spp., *Scenedesmus* spp., *Oocystis* spp., *Monoraphidium circinale*, *Monoraphidium griffithii*, *Kirchneriella* spp., y especies del género *Chlamydomonas* (Fig. 50). No obstante, tanto *Staurastrum* sp.1 como *Kirchneriella* spp. presentaron un comportamiento particular, formando en algunos tratamientos casi verdaderas floraciones. A tiempo inicial el fitoplancton se encontró dominado por *Staurastrum* sp.1 que representó el 56,5% de la abundancia total.

Efecto *L. fortunei*: en ausencia de mejillón se observó que hasta el día 7, *Staurastrum* sp.1 dominó en abundancia la comunidad de fitoplancton con 48 y 38% para los días 1 y 7 respectivamente (Fig. 51 A). A la segunda semana la abundancia relativa bajó a 26% del total y durante el último período experimental disminuyó aún más ($p < 0,01$) a tan solo un 10%. Los grupos que aumentaron a tiempo final a expensas de esta disminución fueron principalmente *Monoraphidium griffithii* y *Oocystis* spp. alcanzando una abundancia del 26% y 16% respectivamente del total de fitoplancton. Por otro lado, en presencia de *L. fortunei*, se observó durante las primeras 24 h una disminución significativa ($p < 0,05$) de *Staurastrum* sp1, pasando del 56,5% al 18%. Al día 1 no se observó una clara dominancia de ninguno de los grupos, ya que lo que hemos denominado como “otros grupos” (conformado por clorofitas cocoides no identificadas y todos los demás grupos de fitoplancton enumerados en las figuras 47-49) ocuparon el 45% de la abundancia total, siendo los principales el nanofitoplancton (18%), las crisofitas (11%) y las cianobacterias filamentosas (8%) (Fig. 51 A). A la semana, se vio un claro y significativo aumento ($p < 0,01$) de la abundancia de *Chlamydomonas* spp. alcanzando un valor relativo del 46%. Al día 14 *Chlamydomonas* spp. volvió a disminuir en su densidad (a un 7%), a la vez que aumentó dramáticamente ($p < 0,01$) *Kirchneriella* spp. a valores de 43% de abundancia relativa. A tiempo final disminuyó nuevamente la abundancia relativa de *Kirchneriella* spp., aumentando en densidad *Staurastrum* sp.3 con 29% de abundancia relativa y *Scenedesmus* spp. con 19%.

Efecto Glifosato: en los tratamientos que evaluaron el efecto del herbicida, el comportamiento de los principales grupos de algas fitoplanctónicas fue semejante a lo ya descrito para los tratamientos sin herbicida (Figs. 51 B-D “(-) *L. fortunei*”). En el

caso de *Staurastrum* sp.1 se pudo observar que en todos los tratamientos, independientemente de la concentración de glifosato utilizada, este grupo dominó las comunidades de clorofitas no-filamentosas durante las primeras dos semanas con abundancias relativas de entre 46-52%, 47-55% y 41-58% para los días 1, 7 y 14 respectivamente. Sin embargo, a tiempo final *Staurastrum* sp.1 sufrió una disminución significativa ($p < 0,01$) en su abundancia relativa llegando a valores relativos de entre el 7 y el 10% (equivalente a 165-183 algas ml^{-1}) del total de algas del fitoplancton.

Efecto Interacción: en los tratamientos con ambos agentes interactuando (Figs. 51 B-D "(+) *L. fortunei*"), se observó que a las 24 h de comenzado el experimento la abundancia de *Staurastrum* sp.1 no difirió significativamente de los tratamientos que evaluaron sólo el efecto glifosato, con valores entre 19-38% del total de algas. A partir del día 7, la abundancia de este grupo fue mínima y significativamente menor ($p < 0,05$) que aquella en tratamientos solo con herbicida, con abundancia relativa siempre menor al 2,5% (excepto en 6+Lf al día 7 que presentó abundancia del 7%). Asimismo, independientemente de la concentración de glifosato utilizada, se vio favorecido el crecimiento de *Chlamydomonas* spp. durante la primera semana, que presentó abundancias relativas al día 7 de 65%, 76% y 30% para las concentraciones de glifosato de 1, 3 y 6 mg l^{-1} respectivamente, siendo significativamente mayor respecto al tiempo anterior ($p < 0,01$). Posteriormente, en la segunda semana, la abundancia de *Chlamydomonas* spp. disminuyó abruptamente a un valor promedio del 2% del total del fitoplancton. Como sucedió con el tratamiento **0+Lf** (Fig. 50), al día 14 aumentó significativamente ($p < 0,01$) la abundancia de *Kirchneriella* spp. siendo el grupo dominante de la comunidad de fitoplancton con valores entre 73-80% de la abundancia total. A tiempo final aumentó la densidad de *Scenedesmus* spp. para todas las concentraciones de glifosato, alcanzando valores de 40%, 30% y 17% de abundancia relativa en los tratamientos **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente.

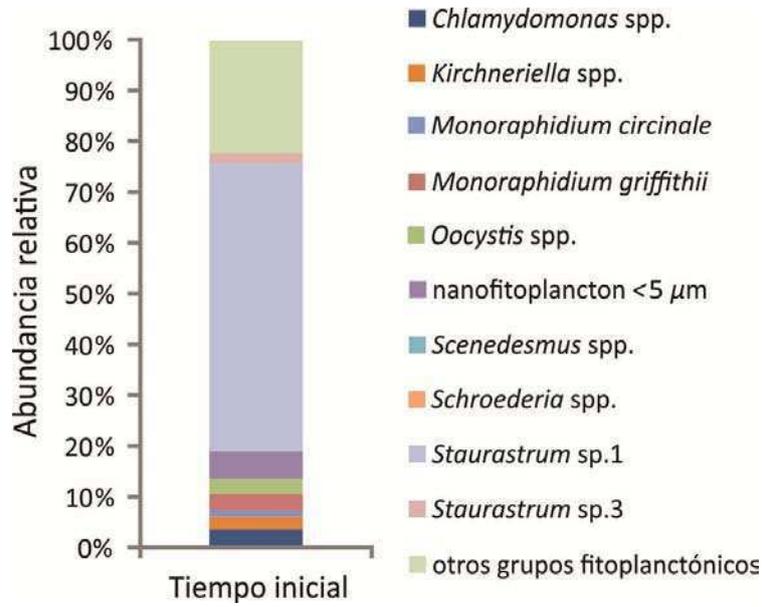
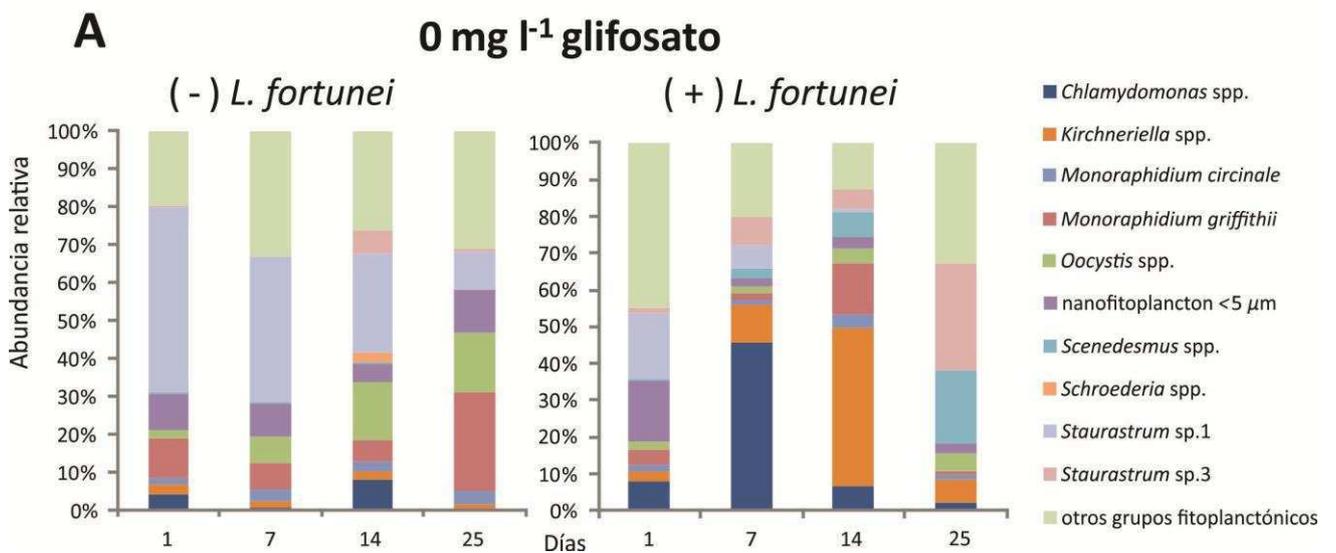


Figura 50: abundancia relativa promedio a tiempo inicial de los principales grupos de clorofitas no-filamentosas como porcentaje del fitoplancton total.



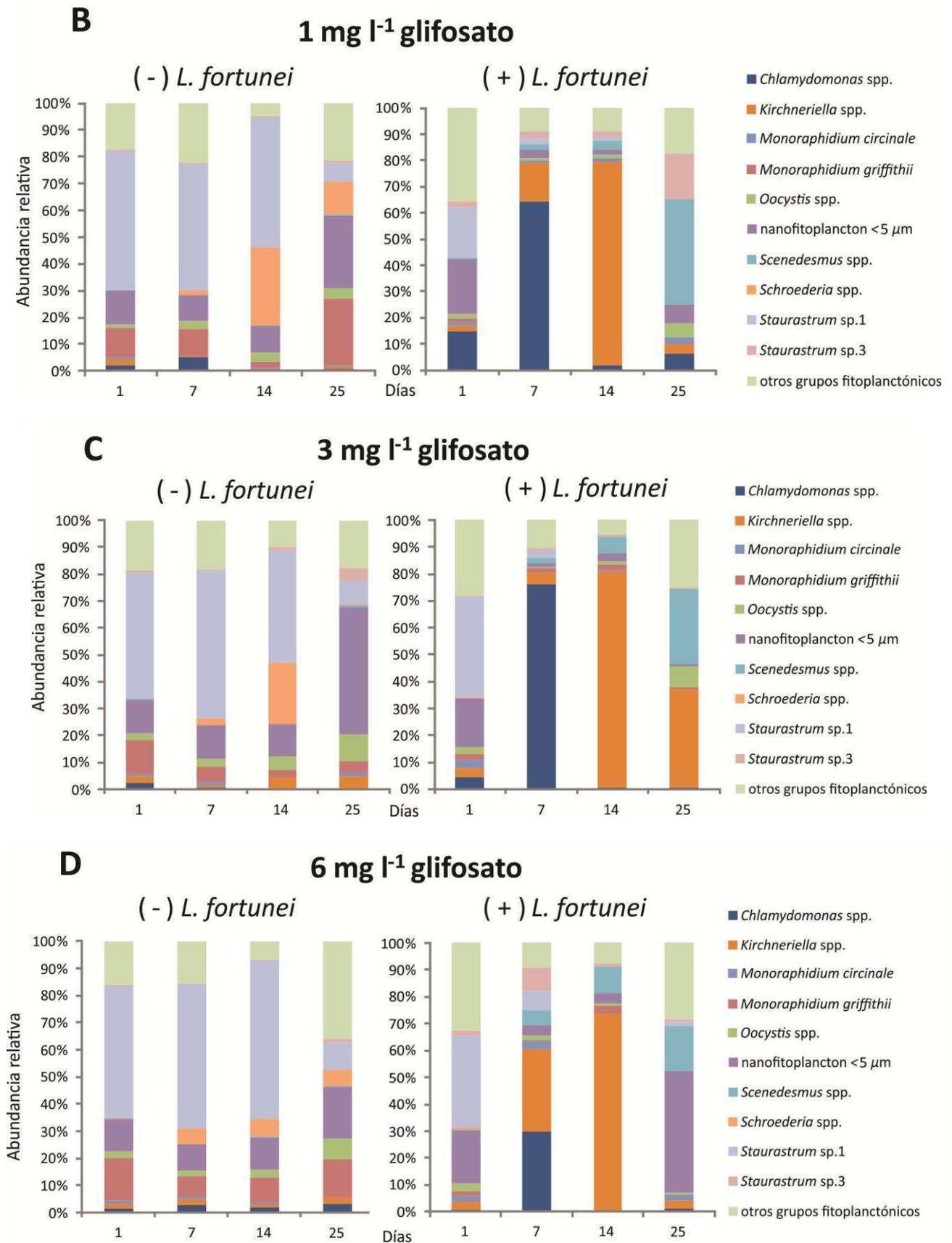


Figura 51 A-D: abundancia relativa promedio de los principales grupos de clorofitas no-filamentosas del fitoplancton a lo largo del tiempo para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato (A-D respectivamente) sin (-) y con (+) *Limnopena fortunei*, como porcentaje del fitoplancton total.

Resumen: Análisis de la composición de las clorofitas no-filamentosas del fitoplancton

- Efecto *L. fortunei*: se observó un patrón de variación de algas fitoplanctónicas distinto en presencia de mejillón, donde a la semana dominó *Chalmydomonas* spp. (46%), seguida por una dominancia de *Kirchneriella* spp. al día 14 (43%). En ausencia de *L. fortunei* en cambio, el fitoplancton se encontró dominado por *Staurastrum* sp.1 durante la primera semana, aumentando a tiempo final *Monoraphidium griffithii*.
- Efecto Glifosato: no se detectó un claro efecto del herbicida, siendo dominante *Staurastrum* sp.1 hasta el tiempo final en todos los tratamientos.
- Efecto Interacción: no se observó con claridad un efecto de la interacción de ambos agentes. No se observó con claridad un efecto conjunto de ambos agentes, siendo preponderante el efecto de *L. fortunei*.

(b.v) Porcentaje de algas muertas por mililitro

Entre las algas muertas (consideradas como aquellas en estado avanzado de deterioro, rotas y/o sin contenido citoplasmático) se encontraron individuos pertenecientes a los siguientes grupos: clorofitas cocoides no identificadas, cenobios de *Coelastrum* sp., diatomeas pennadas, *Oedogonium* spp., *Kirchneriella* spp., *Mallomonas* sp., *Monoraphidium griffithii*, *Oocystis* spp., tres especies de *Staurastrum* (aquí identificadas como “sp.1”, “sp.2” y “sp.3”), *Tetraedron* sp. y *Treubaria* sp. Para todos los tratamientos, al momento de comenzar el experimento el 20 ± 5 % de las algas de fitoplancton se encontraban muertas o en estado avanzado de deterioro.

Efecto *L. fortunei*: el porcentaje de algas muertas respecto al número de algas totales por mililitro en cada tratamiento resultó mayor en los microcosmos sin mejillón que en aquellos con presencia de *Limnoperna fortunei* (Fig. 52 A). Durante las primeras 24 hs en los tratamientos con presencia de mejillón, se observó una clara disminución ($p < 0,01$) de algas muertas, alcanzando un promedio de $8,2 \pm 2,4$ % de algas muertas ml^{-1} . Durante el resto del período experimental, el porcentaje de algas muertas en presencia de mejillón continuó disminuyendo hasta un promedio de $2,4 \pm 1,7$ % al día 25. En ausencia de *L. fortunei*, en cambio, el porcentaje de algas muertas se mantuvo con escasa variación, con valores entre 18-20% hasta tiempo final en donde sufrió una disminución (estadísticamente no significativa) hasta valores de $7,1 \pm 6,2$ % de algas muertas ml^{-1} .

Efecto Glifosato: si bien se observó una variación en el porcentaje de algas muertas a partir del día 7, no se registró efecto del herbicida sobre dicha variable (Fig. 52 B), debido en parte a la alta variabilidad entre réplicas. Los valores oscilaron entre 7 y 21%.

Efecto Interacción: la interacción entre el glifosato y el factor *Limnoperna fortunei* mostró un comportamiento semejante a aquél observado con presencia de mejillón (**O+Lf**) descrito para el “Efecto *L. fortunei*”. Durante las primeras 24 h se observó una disminución significativa ($p < 0,01$) en el porcentaje de algas muertas, con promedios de entre 8-12% de algas muertas ml^{-1} para las distintas concentraciones de glifosato (Fig. 52 C). A lo largo del tiempo el porcentaje de algas muertas continuó disminuyendo gradualmente hasta alcanzar a tiempo final valores de entre 0-2%. Al comparar estos tratamientos con aquellos observados en “Efecto Glifosato”, se observó que la presencia del mejillón generó una reducción en el porcentaje de algas fitoplanctónicas muertas por mililitro, que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto a los tratamientos con ausencia de *L. fortunei* para los días 1, 7 y 25.

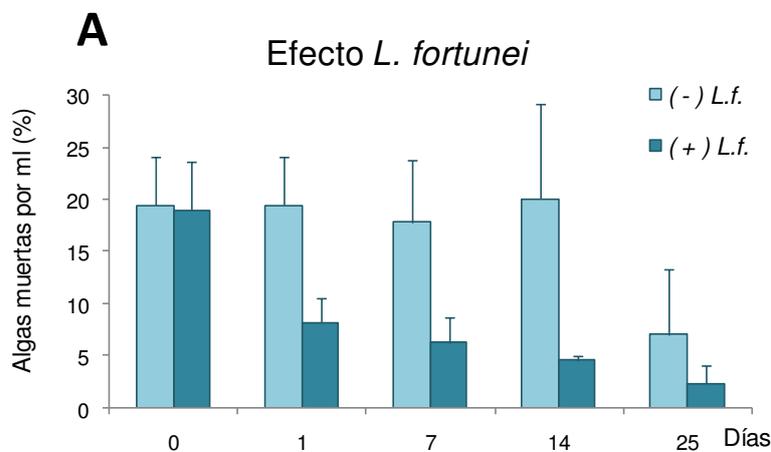
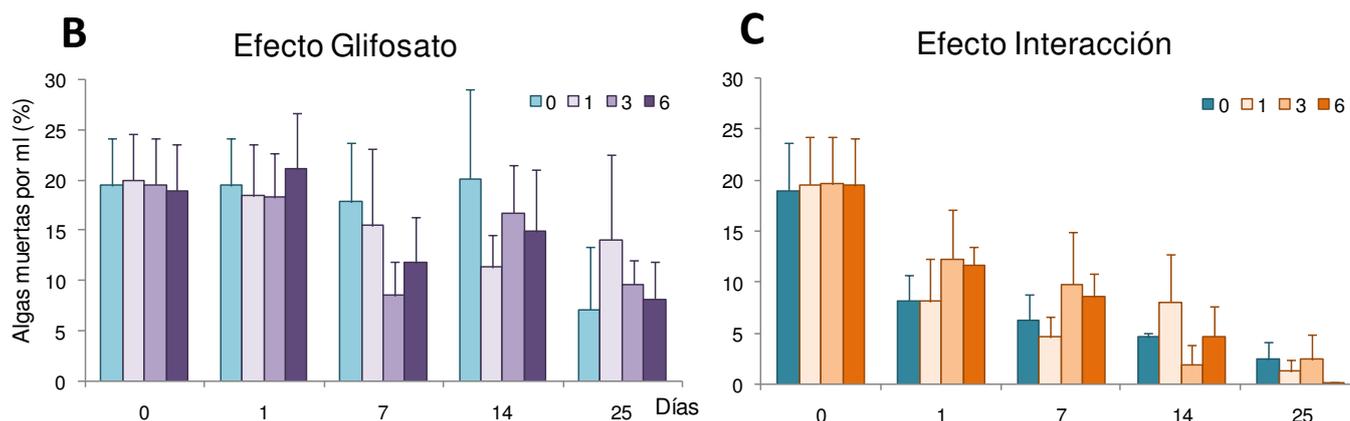


Figura 52 A: concentración media (+ 1 ES) del porcentaje de algas muertas por mililitro en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 52 B y C: concentración media (+ 1 ES) del porcentaje de algas muertas por mililitro del fitoplancton en los distintos tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.

Resumen: porcentaje de algas muertas por mililitro del fitoplancton

- Efecto *L. fortunei*: en presencia del mejillón se registró una disminución significativa en el porcentaje de algas muertas por mililitro a partir del día 1.
- Efecto Glifosato: no se observó efecto del herbicida.
- Efecto Interacción: si bien es predominante el efecto de *L. fortunei*, en interacción con el glifosato la disminución en el porcentaje de algas muertas es menos pronunciada que sin herbicida (**0+Lf**).

c) Perifiton

(c.i) Clorofila-a

El valor promedio de concentración de clorofila-*a* (Chl-*a*) del perifiton a tiempo inicial osciló entre 0,16-0,30 µg cm⁻². Durante el período experimental la Chl-*a* aumentó en todos los tratamientos con excepción del control sin mejillón (tratamiento **0-Lf**) en donde se mantuvo con escasa variación a lo largo del tiempo (Fig. 53).

Efecto *L. fortunei*: en la figura 53 A se puede ver con claridad el efecto del mejillón sobre la Chl-*a* del perifiton ya que al día 7 la Chl-*a* aumentó en presencia de *L. fortunei* (p<0,01), triplicándose y manteniéndose alta con valores promedio entre 0,9 y 1,1 µg cm⁻² hasta tiempo final. En los tratamientos sin mejillón, en cambio, la clorofila no varió demasiado a lo largo de todo el período experimental.

Efecto Glifosato: en los tratamientos que evaluaron el efecto del herbicida sobre la concentración de clorofila del perifiton se observó que partir del día 7 se vio un pequeño (aunque no significativo) aumento en la Chl-*a* en todos los tratamientos con herbicida, que alcanzó sus valores máximos recién a tiempo final, siendo mayor la clorofila en el tratamiento con la dosis más baja de glifosato (**1-Lf**), y menor en aquél con la dosis más alta (**6-Lf**). Los valores de Chl-*a* al día 25 promediaron $1,23 \pm 0,31 \mu\text{g cm}^{-2}$; $0,93 \pm 0,06 \mu\text{g cm}^{-2}$ y $0,65 \pm 0,14 \mu\text{g cm}^{-2}$ para los tratamientos **1-Lf**, **3-Lf** y **6-Lf** (Fig. 53 B).

Efecto Interacción: en los tratamientos con ambos agentes interactuando (Fig. 53 C) la concentración de Chl-*a* perifítica fue mayor respecto a los tratamientos sin mejillón (“Efecto glifosato”), sobre todo durante la primera y la segunda semana (días 7 y 14 con $p < 0,01$). En presencia de mejillón, la Chl-*a* aumentó significativamente durante la primera semana ($p < 0,01$ entre días 1 y 7), a valores de $1,37 \pm 0,41 \mu\text{g cm}^{-2}$; $1,34 \pm 0,35 \mu\text{g cm}^{-2}$ y $1,15 \pm 0,15 \mu\text{g cm}^{-2}$ para los tratamientos **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente. Durante la segunda semana, el tratamiento con la dosis más alta de glifosato (**6+Lf**) siguió en aumento hasta un valor promedio de $1,68 \pm 0,66 \mu\text{g cm}^{-2}$ y durante el resto del experimento los valores de Chl-*a* siguieron siendo altos en todos los tratamientos con mejillón, con promedios entre 1,11 y $1,38 \mu\text{g cm}^{-2}$.

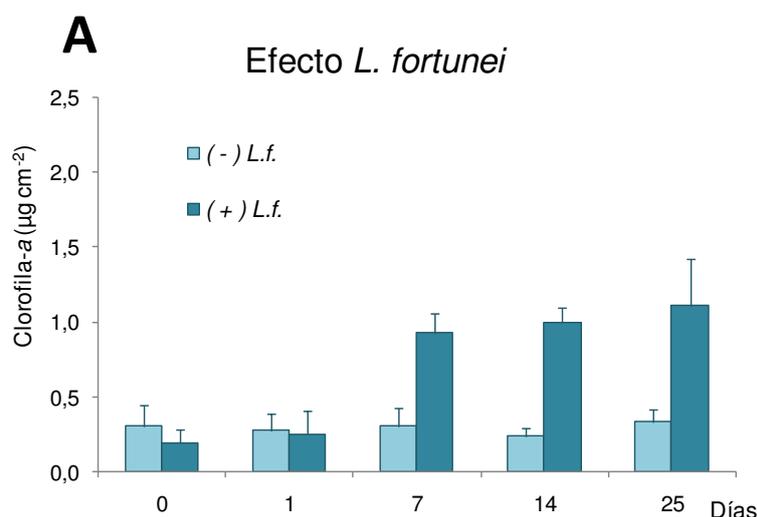
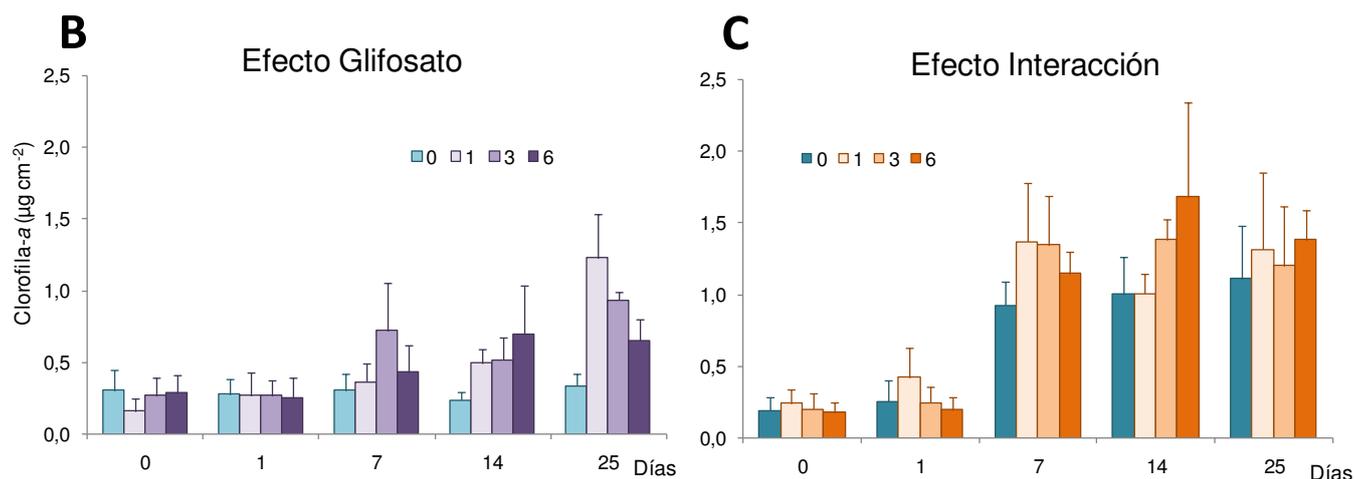


Figura 53 A: concentración media (+ 1 ES) de clorofila-*a* ($\mu\text{g cm}^{-2}$) del perifiton en los tratamientos sin glifosato, con ausencia (- *L.f.*) y presencia (+ *L.f.*) de *Limnoperna fortunei*.



Figuras 53 B y C: concentración media (+ 1 ES) de clorofila-a ($\mu\text{g cm}^{-2}$) del perifiton en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.

Resumen: Clorofila-a del perifiton

- Efecto *L. fortunei*: se observó un significativo aumento en la Chl-a del perifiton en presencia de *L. fortunei* a partir del día 7.
- Efecto Glifosato: se observó una tendencia hacia mayores concentraciones de Chl-a en tratamientos con glifosato.
- Efecto Interacción: se observó una tendencia a un aumento en la Chl-a perifítica en presencia de ambos agentes, tendiendo a un efecto sinérgico.

(c.ii) Peso seco

El peso seco (PS) de la comunidad perifítica presentó gran variabilidad entre réplicas en cada tratamiento. En el tratamiento sin herbicida y sin mejillón (**0-Lf**) se observó que el perifiton siguió en desarrollo visualizándose en el aumento del PS a lo largo del experimento. Este fenómeno pudo ser consecuencia de que al momento del comienzo del ensayo aún no se había alcanzado la madurez en la comunidad. Por otro lado, el confinamiento de los perfitómetros, pasando a microcosmos (70 l) respecto a los mesocosmos (3000 l) donde se había desarrollado, facilitó la disponibilidad de más recursos, acelerando los procesos funcionales de todo el sistema (Brandt *et al.* 2004, Pesce *et al.* 2009), y particularmente del perifiton que se encuentra limitado al sustrato. Si bien hubo una variación en el tiempo, el PS no se vio afectado de manera significativa por el factor herbicida ni por el factor mejillón (Fig. 54). Los valores iniciales de PS

presentaron promedios que variaron entre 0,16 y 0,29 mg cm⁻², y a lo largo del experimento estos valores aumentaron en todos los tratamientos.

Efecto *L. fortunei*: en la figura 54 A se puede observar que el PS comenzó a aumentar a partir del día 7 y continuó en aumento a lo largo del experimento hasta valores de 0,41 ± 0,08 mg cm⁻² y 0,47 ± 0,06 mg cm⁻² para **0-Lf** y **0+Lf** respectivamente a tiempo final, siendo más rápido el aumento en presencia de *L. fortunei*, aunque las diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas.

Efecto Glifosato: si bien se alcanzaron mayores valores de PS en los tratamientos con herbicida respecto al control, no resultaron estadísticamente significativas. El máximo PS se alcanzó a tiempo final en el tratamiento con menor dosis de glifosato (**1-Lf**), con promedio de 0,65 ± 0,13 mg cm⁻² (Fig. 54 B).

Efecto Interacción: con ambos agentes interactuando, el PS aumentó durante las primeras dos semanas, para decrecer durante la tercera semana. Los valores máximos alcanzados (al día 14) promediaron entre 0,44 y 0,53 mg cm⁻². Independientemente de la concentración de glifosato, en presencia de mejillón se observaron diferencias significativas en tiempos consecutivos ($p < 0,01$), durante la primera semana (días 1 y 7) y durante la segunda semana (días 7 y 14) (Fig. 54 C). No obstante, no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos indicando que no hay efecto conjunto sobre el PS del perifiton.

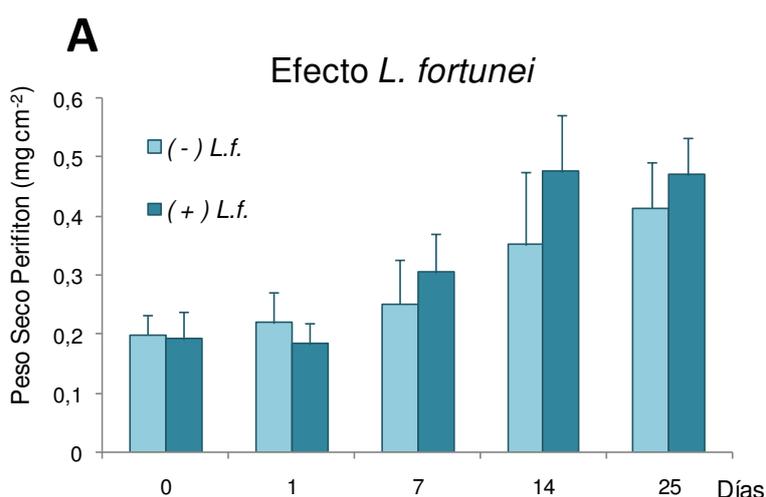


Figura 54 A: concentración media (+ 1 ES) de peso seco (mg cm⁻²) del perifiton en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei*.

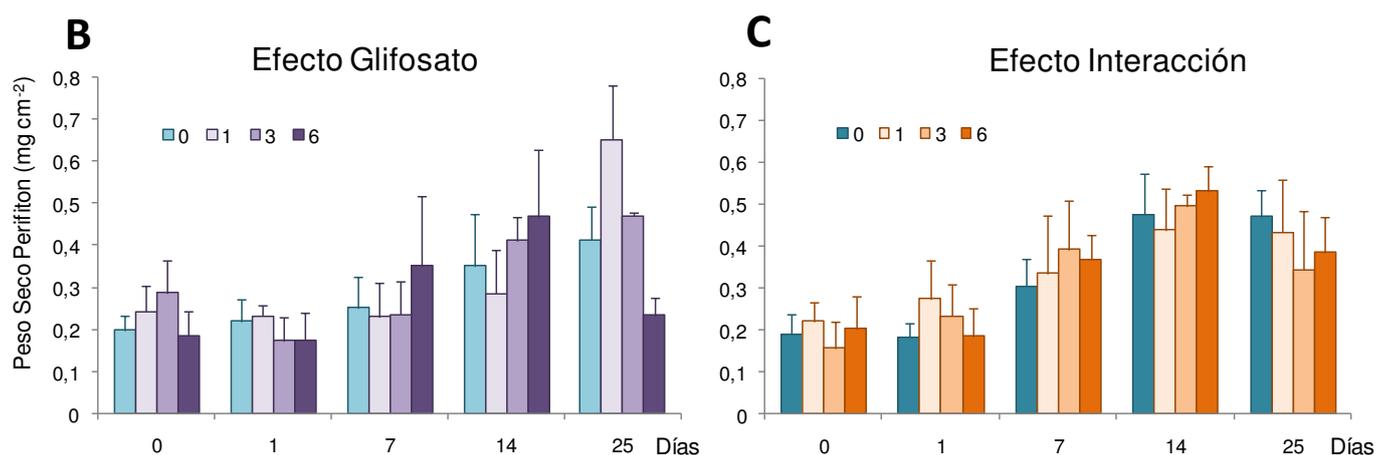


Figura 54 B y C: concentración media (+ 1 ES) de peso seco (mg cm^{-2}) del perifiton en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei* durante el periodo experimental.

Resumen: Peso seco del perifiton

- Efecto *L. fortunei*: no se detectó efecto mejillón.
- Efecto Glifosato: se observó una tendencia al estímulo del desarrollo de la comunidad a tiempo final, para la menor concentración del herbicida.
- Efecto Interacción: no se evidenció efecto de la interacción glifosato x *L. fortunei* aunque a tiempo final, se observó tendencia a la disminución en los tratamientos con presencia de ambos agentes

(c.iii) Cenizas

El peso de las cenizas (C) de la fracción perifítica fue en promedio siempre inferior a $0,08 \text{ mg cm}^{-2}$ (Fig. 55). Si bien se observó un aumento hacia el tiempo final en todos los tratamientos, las C presentaron gran variabilidad entre réplicas y entre tratamientos, sin registrarse diferencias significativas entre ellos.

Efecto *L. fortunei*: se observó una tendencia al aumento gradual con el tiempo en los tratamientos que evaluaron el efecto *Limnoperna fortunei* (Fig. 55 A), alcanzando sus valores máximos a tiempo final, con valores de $0,05 \pm 0,01 \text{ mg cm}^{-2}$ tanto para **0-Lf** como para **0+Lf**.

Efecto Glifosato: en los tratamientos con herbicida (Fig. 55 B), el aumento en C se produjo antes que en el tratamiento control (**0-Lf**), de manera más repentina y con mayor variabilidad. El valor máximo de C se con la dosis de 1 mg l^{-1} de glifosato, a las 24

h de comenzado el experimento, en donde se alcanzó un promedio de $0,05 \pm 0,03 \text{ mg cm}^{-2}$ para **1-Lf**.

Efecto Interacción: si bien no se observaron diferencias entre tratamientos (Fig. 55 C), el aumento de C se produjo a partir de las 24 h, con un máximo bien diferenciado en el tratamiento **1+Lf** al día 1 que alcanzó un promedio de $0,08 \pm 0,03 \text{ mg cm}^{-2}$.

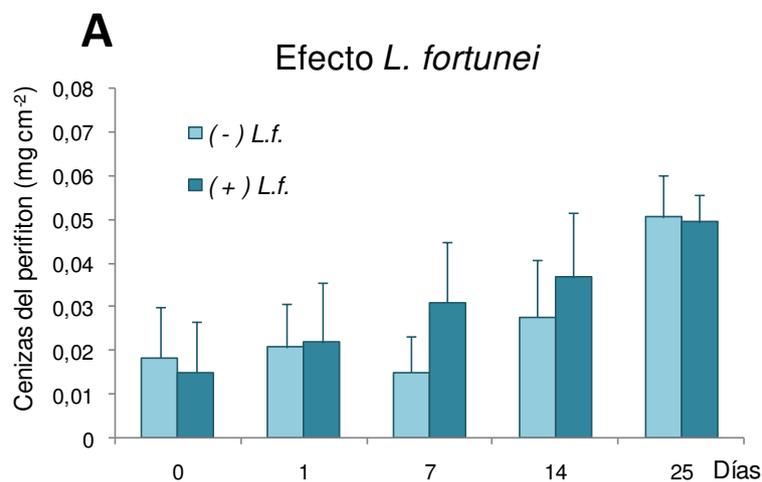
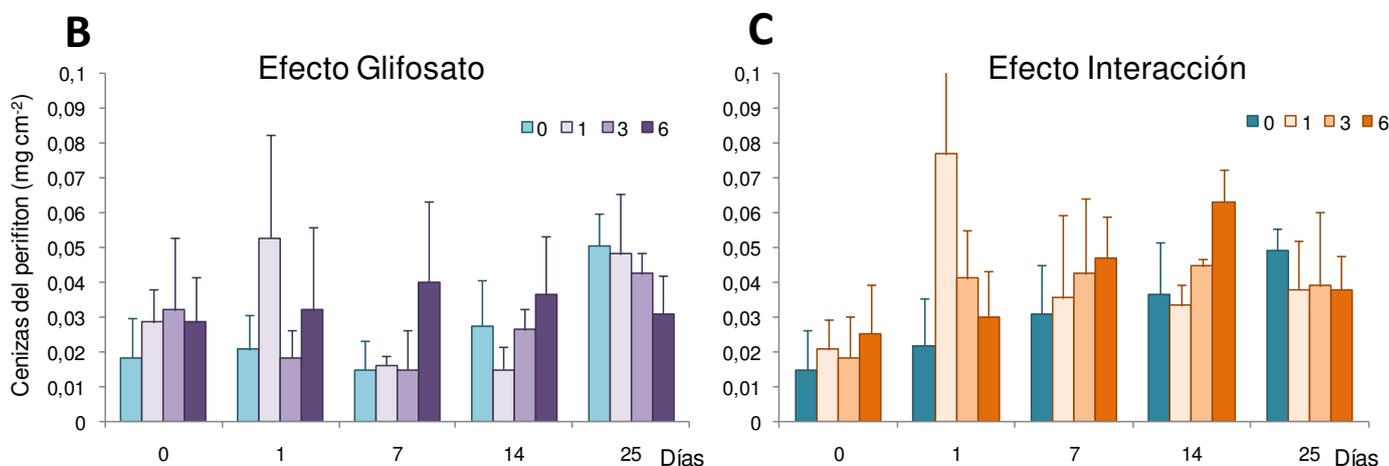


Figura 55 A: Peso medio (+ 1 ES) de cenizas (mg cm^{-2}) del perifiton en los tratamientos sin glifosato, sin (-L.f.) y con (+L.f.) *Limnoperna fortunei*.



Figuras 55 B y C: Peso medio (+ 1 ES) de cenizas (mg cm^{-2}) del perifiton en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.

Resumen: Cenizas del Perifiton

- Efecto *L. fortunei*: no se evidenció un claro efecto del mejillón.
- Efecto Glifosato: no se detectó efecto glifosato.
- Efecto Interacción: la interacción glifosato x *L. fortunei* no generó diferencias entre tratamientos.

(c.iv) Peso seco libre de cenizas

El peso seco libre de cenizas (PSLC) del perifiton refleja la cantidad de material orgánico de la comunidad perifítica. En el experimento se vio un comportamiento muy semejante a aquél detallado en la variable “peso seco”, en donde no se registraron diferencias significativas dadas por el factor mejillón, ni por el factor glifosato, pero sí se observó en cambio un aumento en los valores de PSLC a lo largo del tiempo (Fig. 56). Los valores iniciales de PSLC promediaron entre 0,14-0,26 mg cm⁻² y hasta el día 14 hubo un aumento en el PSLC en todos los tratamientos que resultó estadísticamente significativo ($p < 0,01$) entre la primera semana (del día 1 al día 7) y entre la segunda semana (del día 7 al día 14).

Efecto *L. fortunei*: se pudo observar que tanto en ausencia como en presencia de mejillón los valores de PSLC aumentaron durante las primeras dos semanas experimentales entre 1,8 y 2,5 veces respecto a los valores iniciales, siendo mayor (aunque estadísticamente no significativo) los valores de PSLC alcanzados en presencia de mejillón respecto a aquellos sin mejillón (Fig. 56 A).

Efecto Glifosato: para todas las concentraciones de glifosato el PSLC aumentó a partir del día 1 durante el experimento, excepto para el tratamiento con la mayor dosis de glifosato (**6-Lf**) que sufrió una rápida disminución del 47% durante la última semana (Fig. 56 B). Los máximos valores alcanzados fueron al día 25 de $0,60 \pm 0,11$ mg cm⁻² y $0,43 \pm 0,01$ mg cm⁻² para los tratamientos **1-Lf** y **3-Lf**. El tratamiento **6-Lf** en cambio alcanzó su valor máximo en la segunda semana con un promedio de $0,43 \pm 0,15$ mg cm⁻².

Efecto Interacción: en los tratamientos con *L. fortunei* y glifosato, los valores máximos de PSLC se alcanzaron al día 14 con promedios de entre 0,41-0,47 mg cm⁻² (Fig. 56 C).

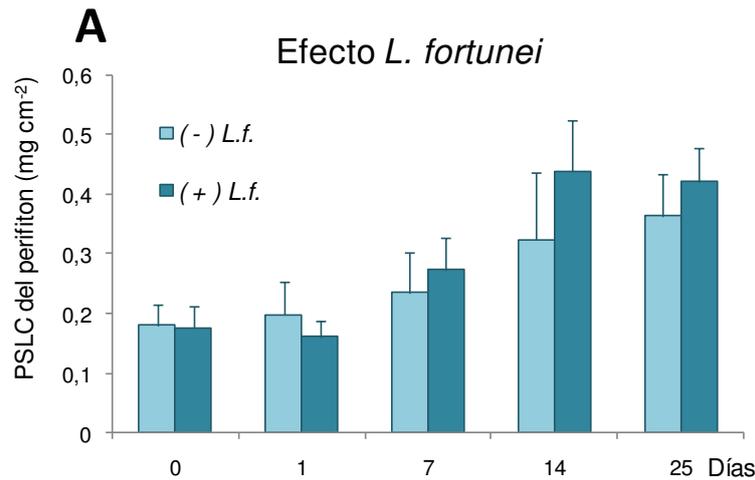
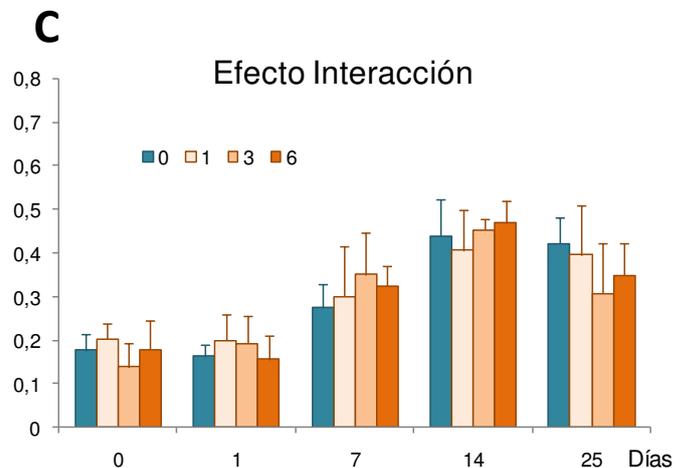
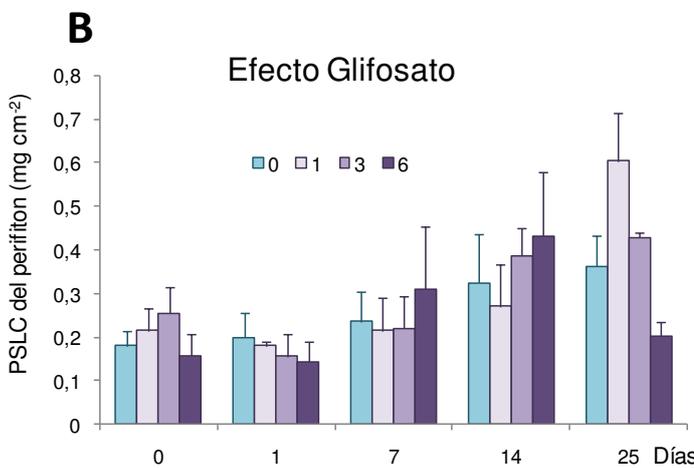


Figura 56 A: Peso seco libre de cenizas (mg cm^{-2}) (+ 1 ES) del perifiton en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei*.



Figuras 56 B y C: Peso seco libre de cenizas (mg cm^{-2}) (+ 1 ES) del perifiton en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.

Resumen: Peso seco libre de cenizas del perifiton

- Efecto *L. fortunei*: a partir del día 7, el PSLC en presencia de mejillón fue levemente mayor.
- Efecto Glifosato: no se detectó un claro efecto del glifosato sobre el PSLC.
- Efecto Interacción: no se registró efecto de la interacción glifosato x *L. fortunei*.

(c.v) Índice Autotrófico

En nuestro estudio, los valores promedio de los IA iniciales variaron entre 890 y 1915 indicando en todos los tratamientos comunidades fundamentalmente heterotróficas. Como la variación inicial a tiempo cero fue alta, se relativizó el IA de

cada muestra en los sucesivos tiempos a su valor inicial, y se graficó el promedio del porcentaje de variación del IA de cada tratamiento respecto al IA inicial (Fig. 57).

Efecto *L. fortunei*: se observó un claro efecto del mejillón sobre el índice autotrófico de la comunidad de perifiton (Fig. 57 A). En ausencia de *L. fortunei* el IA aumentó a partir del día 7 durante la segunda y la tercer semana hasta alcanzar un porcentaje promedio de $260 \pm 150 \%$ a tiempo final (equivalente a un IA de 1175 ± 492). El tratamiento con *Limnoperna fortunei*, en cambio, sufrió una disminución en su IA a un 29% (lo que equivale a un IA de 252 ± 12) al día 7 y se mantuvo relativamente bajo durante las siguientes semanas para finalizar con un valor de IA del 50% del valor inicial (IA de 398 ± 134).

Efecto Glifosato: a diferencia de lo observado sin herbicida (**0-Lf**), los tratamientos con agregado de glifosato sufrieron una disminución en su IA durante el período experimental, siendo considerablemente menor al control en los días 14 y 25. Si bien a tiempo final el IA en los tratamientos con glifosato arrojó valores menores al 52% del IA inicial (IA promedio a tiempo 0 fue de 1916, 1560 y 784 en **1-Lf**, **3-Lf** y **6-Lf** respectivamente), a tiempo final el IA calculado varió entre 280-440, indicando una clara tendencia hacia la autotrofia producto del mayor desarrollo algal (Fig. 57 B).

Efecto Interacción: a lo largo del experimento se observó una disminución en el IA respecto a los valores iniciales (Fig. 57 C). Sin embargo, para las dosis media y alta de herbicida (**3+Lf** y **6+Lf**) el IA sufrió un pequeño aumento a las 24 h de hasta un 127% y 105% respectivamente. A partir de allí, disminuyó drásticamente al día 7 para mantener valores bajos durante el resto del experimento, aunque siempre por encima de un IA de 200. En el tratamiento con 1 mg l^{-1} de glifosato, el IA disminuyó durante la primera semana a un 34% lo que significó un IA promedio de 188 ± 32 . A pesar de observarse diferentes comportamientos para esta variable según los tratamientos, al haber tanta variabilidad entre réplicas, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

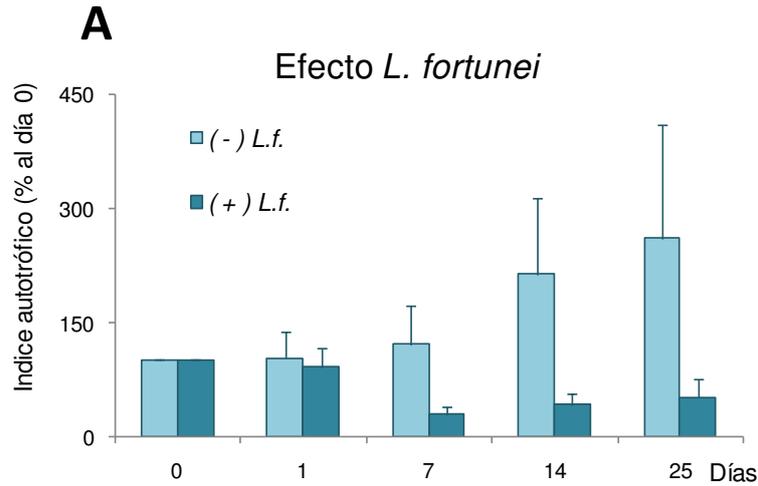
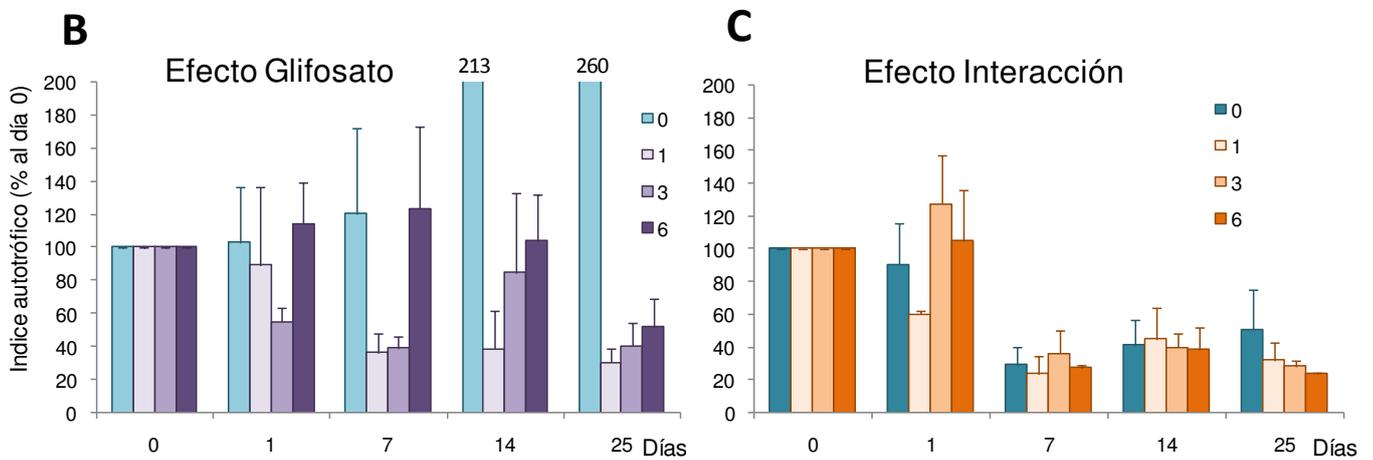


Figura 57 A: concentración media (+ 1 ES) del índice autotrófico (como porcentaje respecto al tiempo inicial) del perifiton en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperla fortunei*.



Figuras 57 B y C: concentración media (+ 1 ES) del índice autotrófico (como porcentaje respecto al tiempo inicial) del perifiton en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperla fortunei* durante el período experimental.

Resumen: Índice autotrófico del perifiton

- Efecto *L. fortunei*: se observó una marcada tendencia a la disminución del IA (perifiton más autotrófico) en presencia del mejillón.
- Efecto Glifosato: el herbicida generó la tendencia a la disminución del IA (comunidad más autotrófica).
- Efecto Interacción: no se observó un efecto conjunto diferente al de los factores por separado, estando el comportamiento general determinado por la presencia del mejillón. A tiempo final, se observó una tendencia de presentar una mayor autotrofia a mayor concentración de glifosato.

(c.vi) Recuentos: algas cm⁻²

Los valores iniciales de algas perifíticas variaron entre 82 mil y 217 mil algas cm⁻² según el tratamiento, presentando gran variación entre réplicas.

Efecto *L. fortunei*: no se observó efecto del mejillón sobre el número de algas del perifiton entre el tiempo inicial y el final (Fig. 58 A). Si bien a tiempo inicial el número de algas por cm² fue levemente menor en el tratamiento sin *L. fortunei*, a tiempo final el número de algas perifíticas resultó semejante en ambos tratamientos.

Efecto Glifosato: en general se pudo observar que para todos los tratamientos, el número de algas totales por cm² no varió demasiado entre los dos tiempos estudiados. En los tratamientos con 1 mg l⁻¹ de glifosato (**1-Lf**) se observó que tanto a tiempo inicial como a tiempo final, la concentración de algas perifíticas fue mayor (aunque sin diferencias significativas) que en el tratamiento sin glifosato (**0-Lf**) (Fig. 58 B). En las dosis media y alta de glifosato en cambio (**3-Lf** y **6-Lf**), la concentración de algas del perifiton fue menor que en los microcosmos sin herbicida. Sin embargo, el tratamiento **3-Lf** presentó una variación en el tiempo, siendo significativamente mayor (p<0,05) la abundancia de algas de perifiton por cm² a tiempo final respecto a tiempo inicial.

Efecto Interacción: a pesar de no observarse un efecto de los factores por separado, la interacción de *L. fortunei* con el glifosato generó un comportamiento distinto en las algas perifíticas (Fig. 58 C). En el tratamiento **1+Lf** el número de algas totales perifíticas a tiempo final fue estadísticamente menor al valor inicial (en promedio representó un 37 ± 8 % del valor inicial), mientras que para el tratamiento **3+Lf** a tiempo final se vio un aumento en el número de algas hasta valores de 219 mil ± 3 mil algas cm² que representó un 200 ± 87 % del valor inicial (p<0,05 para ambos tratamientos). El tratamiento de **6+Lf** no varió significativamente entre el tiempo inicial y el final.

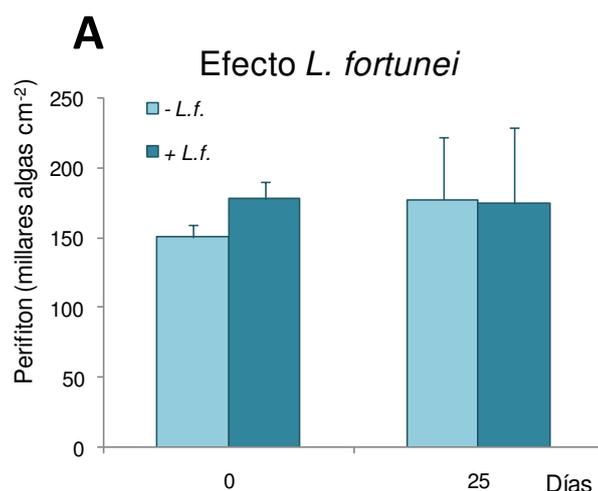
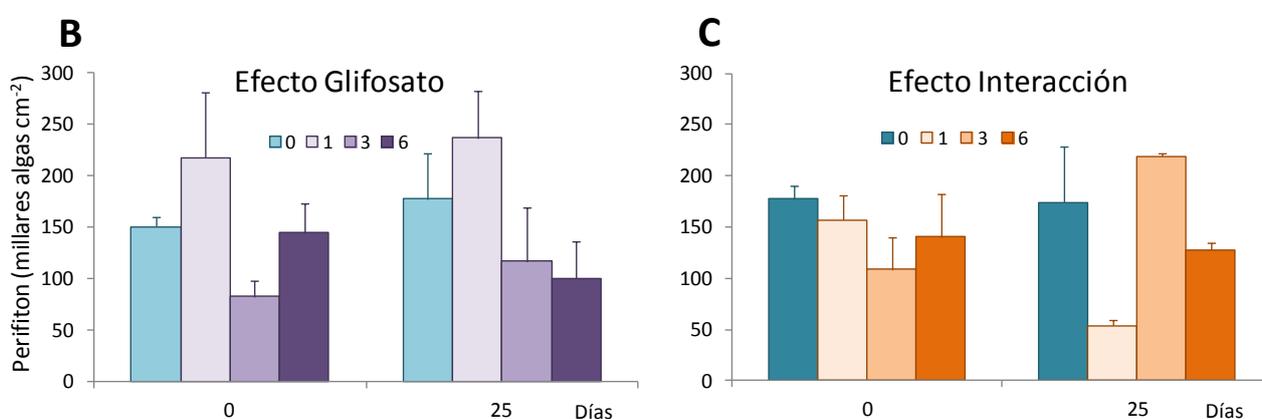


Figura 58 A: concentración media (+ 1 ES) del número de algas perifíticas por cm² en los tratamientos sin glifosato, sin (-L.f.) y con (+ L.f.) *Limnoperna fortunei*.



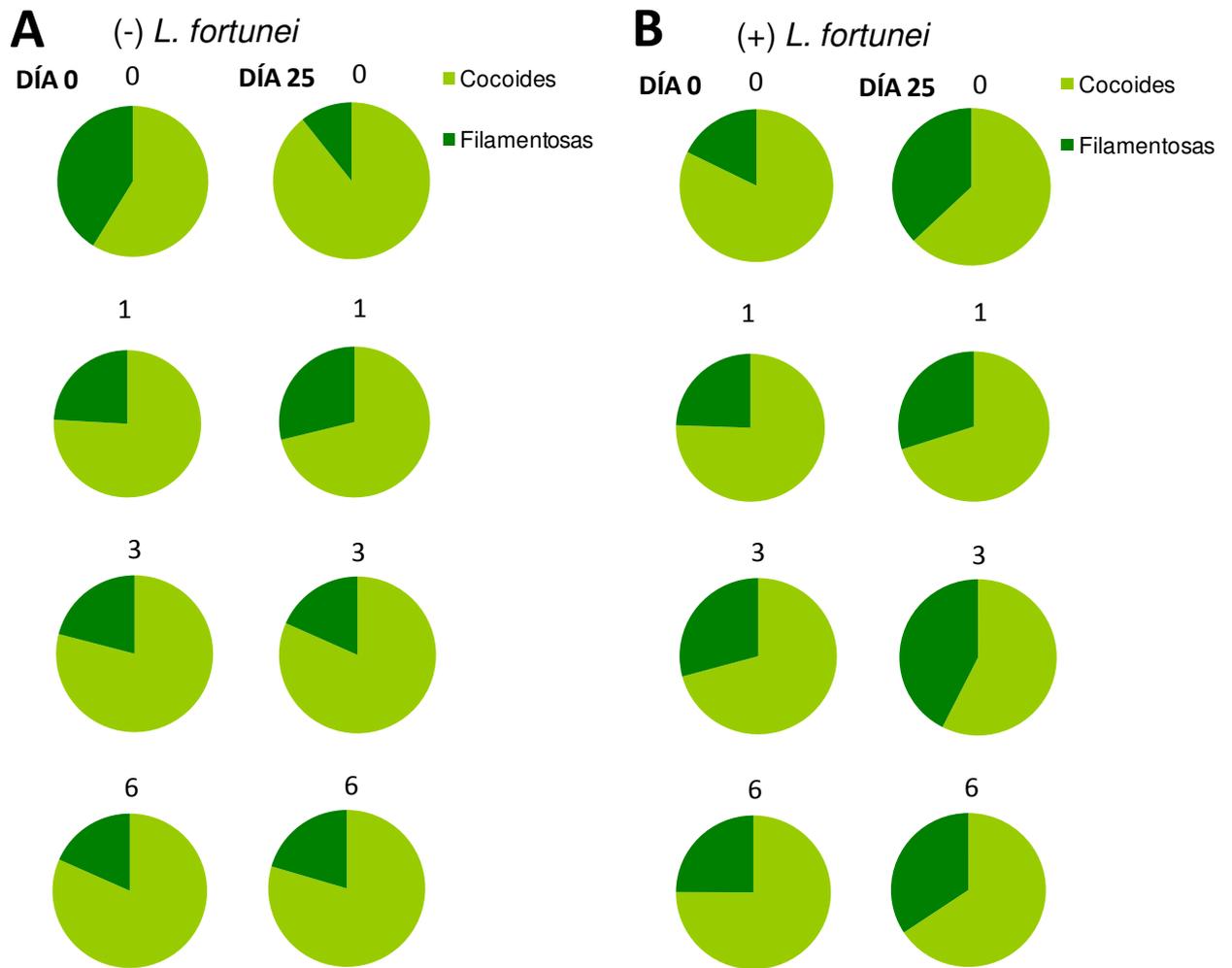
Figuras 58 B y C: concentración media (+ 1 ES) del número de algas perifíticas por cm² en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.

Resumen: Recuentos del perifiton

- Efecto *L. fortunei*: no se registró efecto del mejillón sobre el número de algas del perifiton.
- Efecto Glifosato: no se detectó efecto del herbicida sobre el número de algas del perifiton.
- Efecto Interacción: la interacción de ambos agentes podría estar afectando de manera indirecta el número de algas del perifiton ya que en presencia del mejillón los tratamientos con distintas concentraciones de glifosato respondieron de diferente manera.

(c.vii) Algas cocoides vs. algas filamentosas

En función de la aparición de gran cantidad de algas filamentosas microscópicas - formando matas visibles a ojo desnudo- en algunos microcosmos, decidimos realizar la comparación entre hábitos algales en el perifiton. Para esto se contabilizó el número de algas de hábito cocoide (algas solitarias y coloniales, tanto flageladas como sin flagelo) y de las algas filamentosas. Al comparar el número de algas filamentosas respecto a aquellas con hábito cocoide, se observó que en todos los tratamientos, tanto a tiempo inicial como final, el hábito cocoide predominó sobre el filamentosos ($p < 0,05$). En los tratamientos con ausencia de *L. fortunei*, si bien se registró variación en el tiempo, esta no fue significativa, como tampoco se observó efecto del factor glifosato (Fig. 59). En presencia de mejillón la abundancia relativa de algas filamentosas aumentó a tiempo final en todos los tratamientos, con porcentaje de filamentosas entre 28 y 37%. La presencia de **metafiton** se pudo observar a simple vista a tiempo final en todos aquellos microcosmos que contenían al mejillón (ver Fig. 60 y 61). El metafiton es una comunidad formada por algas filamentosas que puede llegar a dimensiones macroscópicas. Las algas que lo conforman suelen ser algas verdes filamentosas de los géneros *Spirogyra*, *Mougeotia* o *Zygnema*, que cuando adultas no viven adheridas directamente a un sustrato (Stevenson 1996). Si bien las algas del metafiton son algas microscópicas de mayor tamaño respecto de aquellas del perifiton, en sus estadíos iniciales se desarrollan adheridas a un sustrato. A medida que crecen el conjunto deviene en matas algales macroscópicas que pasan a formar parte de la columna de agua al desprenderse del sustrato del cual se iniciaron (Stevenson 1996), ayudadas por las burbujas de oxígeno producto de la fotosíntesis y al movimiento del agua generado por brisa y/o los aireadores. Durante la toma de muestras de los sustratos colonizados por perifiton se intentó retirar las matas macroscópicas de metafiton para evitar alterar los análisis cuanti y cualitativos del perifiton.



Figuras 59 A y B: porcentaje de algas perifíticas con hábito cocoidal (en verde claro) y filamentoso (en verde oscuro) al comienzo y al final del experimento (días 0 y 25) en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (A) y con (B) *Limnoperna fortunei*.



Figura 60: microcosmos de tratamientos con ambos agentes (*Limnoperna fortunei* y glifosato) a tiempo final, donde se puede observar a simple vista el metafiton alrededor de los perfitómetros (indicado con flechas rojas).



Figuras 61 A y B: extracción de muestras de perifiton a tiempo final, donde se puede observar una gran cantidad de metafiton (indicado con flechas en rojo) adherido a: (A) las jaulas de *Limnoperna fortunei* y (B) al perifitómetro.

El desarrollo del metafiton no fue observado en ausencia de *Limnoperna fortunei* y herbicida, donde para el tratamiento **0-Lf** hubo un alto porcentaje de algas filamentosas a tiempo inicial ($38 \pm 20\%$) que se vio reducido a tiempo final (a $10 \pm 3\%$). Sin embargo, en el tratamiento con la menor dosis de glifosato (**1-Lf**), hubo un pequeño aumento de las filamentosas en el tiempo (de $23 \pm 6\%$ a $30 \pm 3\%$). En las otras dos concentraciones de herbicida (**3-Lf** y **6-Lf**), no se observaron grandes variaciones en la proporción de filamentosas en el tiempo. La alta variabilidad entre las réplicas dificultó el análisis estadístico y por lo tanto no se pudieron detectar diferencias significativas en los porcentajes de algas filamentosas y cocoides entre tiempos.

Resumen: algas cocoides vs. algas filamentosas del perifiton

- Efecto *L. fortunei*: en presencia del mejillón, el porcentaje de algas filamentosas aumentó en el tiempo.
- Efecto Glifosato: no se observó efecto glifosato.
- Efecto Interacción: la acción conjunta del mejillón y el glifosato generó una tendencia al aumento de algas filamentosas, semejante al impacto de *L. fortunei* por separado.

Debido al importante desarrollo del metafiton, se realizó una estimación semicuantitativa de la abundancia de dichas matas a tiempo final para cada tratamiento a través de una escala semicuantitativa de observación a ojo desnudo. La escala consistió

en cuatro niveles para determinar la ausencia (0) o presencia escasa (+), presencia abundante (++) y presencia muy abundante (+++) de menor a mayor abundancia de metafiton en cada microcosmos. En las Figs. 62-64 se muestran fotografías de todos los microcosmos a tiempo final y el valor correspondiente asignado según la escala semicuantitativa, para cada tipo de efecto. Bajo microscopio óptico se observó que el metafiton se encontró conformado mayormente por algas filamentosas del tipo zygnematales.

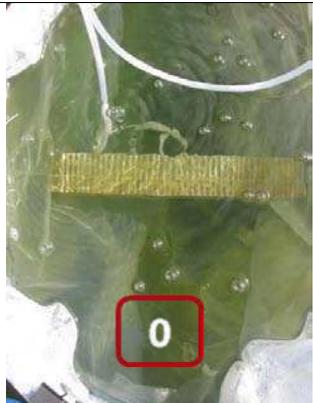
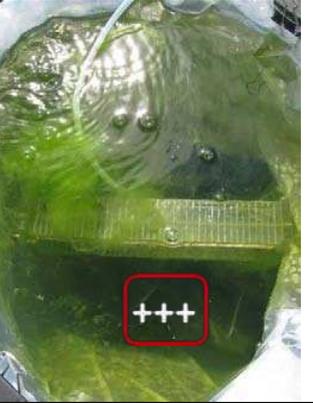
Efecto <i>L. fortunei</i>	Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3
0-Lf			
0+Lf			

Figura 62: fotografías de los microcosmos a tiempo final (día 25) para los tratamientos que evaluaron el efecto *L. fortunei*, con ausencia (-Lf) y presencia (+Lf) de *Limnoperna fortunei*, para las tres réplicas de cada tratamiento. En recuadro rojo se indica el valor establecido según la escala semi-cuantitativa (0, +, ++ y +++) de la abundancia macroscópica de metafiton.

Sección II: Resultados

Efecto Glifosato	Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3
0-Lf			
1-Lf			
3-Lf			
6-Lf			

Figura 63: fotografías de los microcosmos a tiempo final (día 25) para los tratamientos que evaluaron el efecto Glifosato; con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, en ausencia de *L. fortunei* (-Lf), para las tres réplicas. En recuadro rojo

Sección II: Resultados

se indica el valor establecido según la escala semi-cuantitativa (0, +, ++ y +++) de la abundancia macroscópica de metafiton.

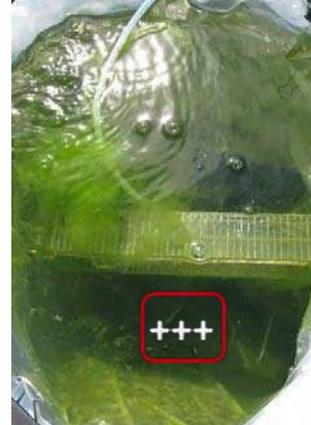
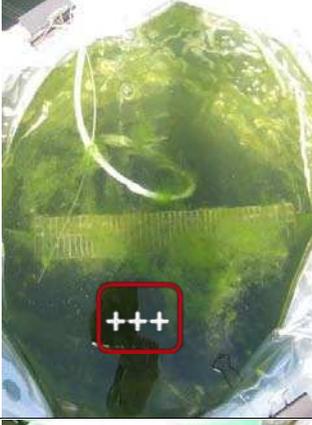
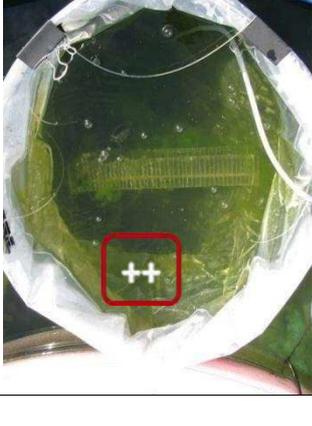
Efecto Interacción	Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3
0+Lf			
1+Lf			
3+Lf			

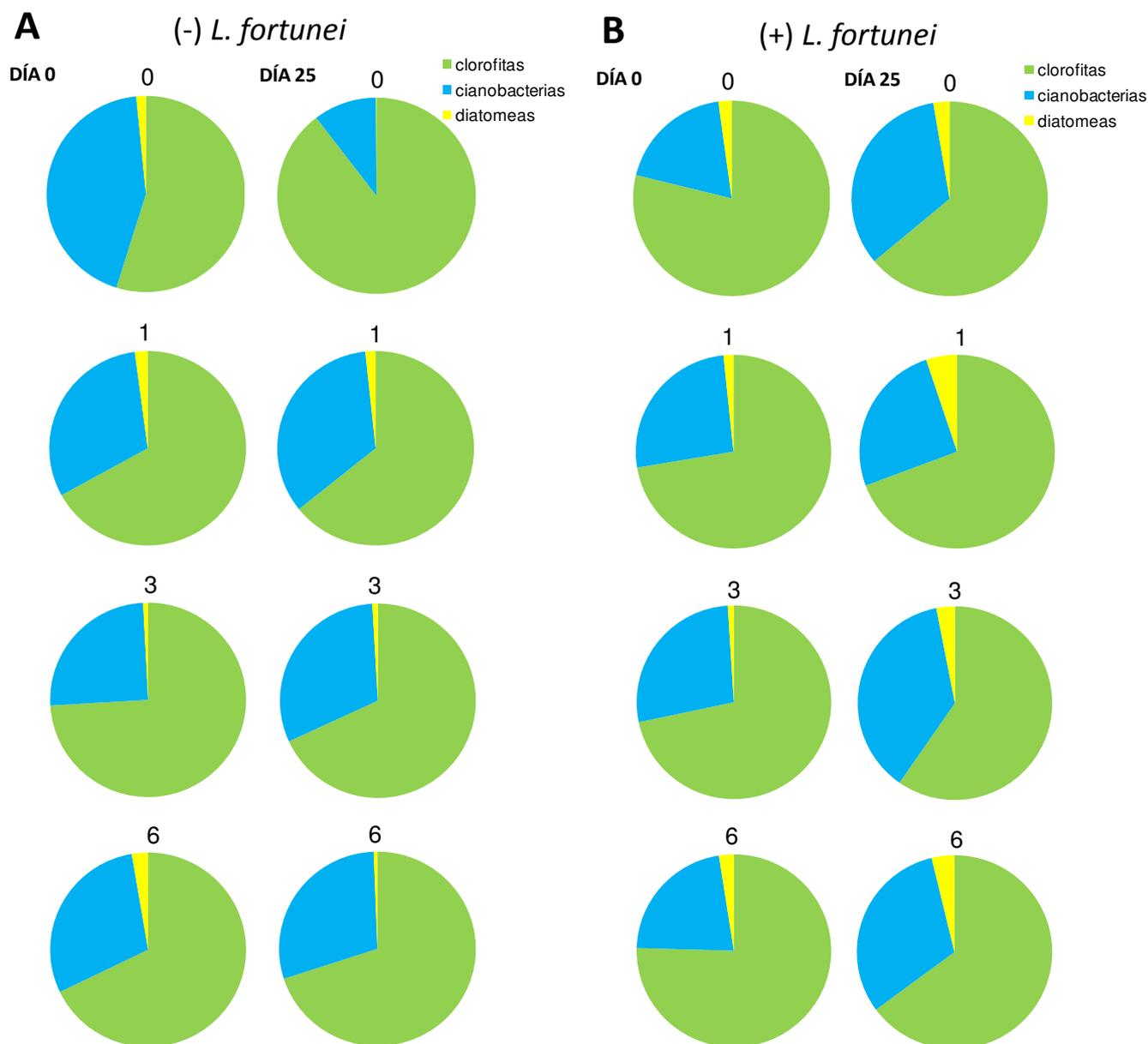


Figura 64: fotografías de todos los microcosmos a tiempo final (día 25) para los tratamientos que evaluaron el efecto Interacción (glifosato x *L. fortunei*); con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, en presencia de *L. fortunei* (-Lf), para las tres réplicas de cada tratamiento. El recuadro en rojo indica el valor establecido según la escala semi-cuantitativa (0, +, ++ y +++) de la abundancia macroscópica de metafiton.

(c.viii) Principales grupos algales

Se realizaron diagramas de torta para considerar la relación entre los principales grupos algales del perifiton (clorofitas, cianobacterias y diatomeas) y su variación en el tiempo para los distintos tratamientos (Fig. 65). Si bien estadísticamente no se observaron diferencias significativas en el tiempo para los grupos de clorofitas y cianobacterias, se puede ver que, en términos generales, hubo un aumento de las cianobacterias en el tiempo, en aquellos tratamientos con presencia de *L. fortunei* (excepto para la concentración de 1 mg l⁻¹ de glifosato), con un aumento de 76%, 37% y 42% para **0+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente, a expensas de una disminución en el porcentaje de clorofitas para estos mismos tratamientos. En ausencia del mejillón, en cambio, no se vieron grandes variaciones en estos grupos algales entre los tiempos estudiados, excepto para el tratamiento sin herbicida (**0-Lf**), en donde a tiempo inicial se encontró un 44 ± 18 % de cianobacterias que a tiempo final se vio reducido a un 10 ± 4 %.

Para las diatomeas, en cambio, se observaron diferencias significativas a tiempo final ($p < 0,01$) entre los tratamientos con ausencia y presencia de mejillón, siendo significativamente mayor el porcentaje de diatomeas en presencia de mejillón para todas las concentraciones de herbicida. A tiempo final, el porcentaje de diatomeas en los tratamientos sin mejillón resultó inferior al 1% excepto para el tratamiento **1-Lf** en donde fue del 1,7%, mientras que en presencia de mejillón el porcentaje de diatomeas se encontró entre 2,7% y 3,8% según el tratamiento.



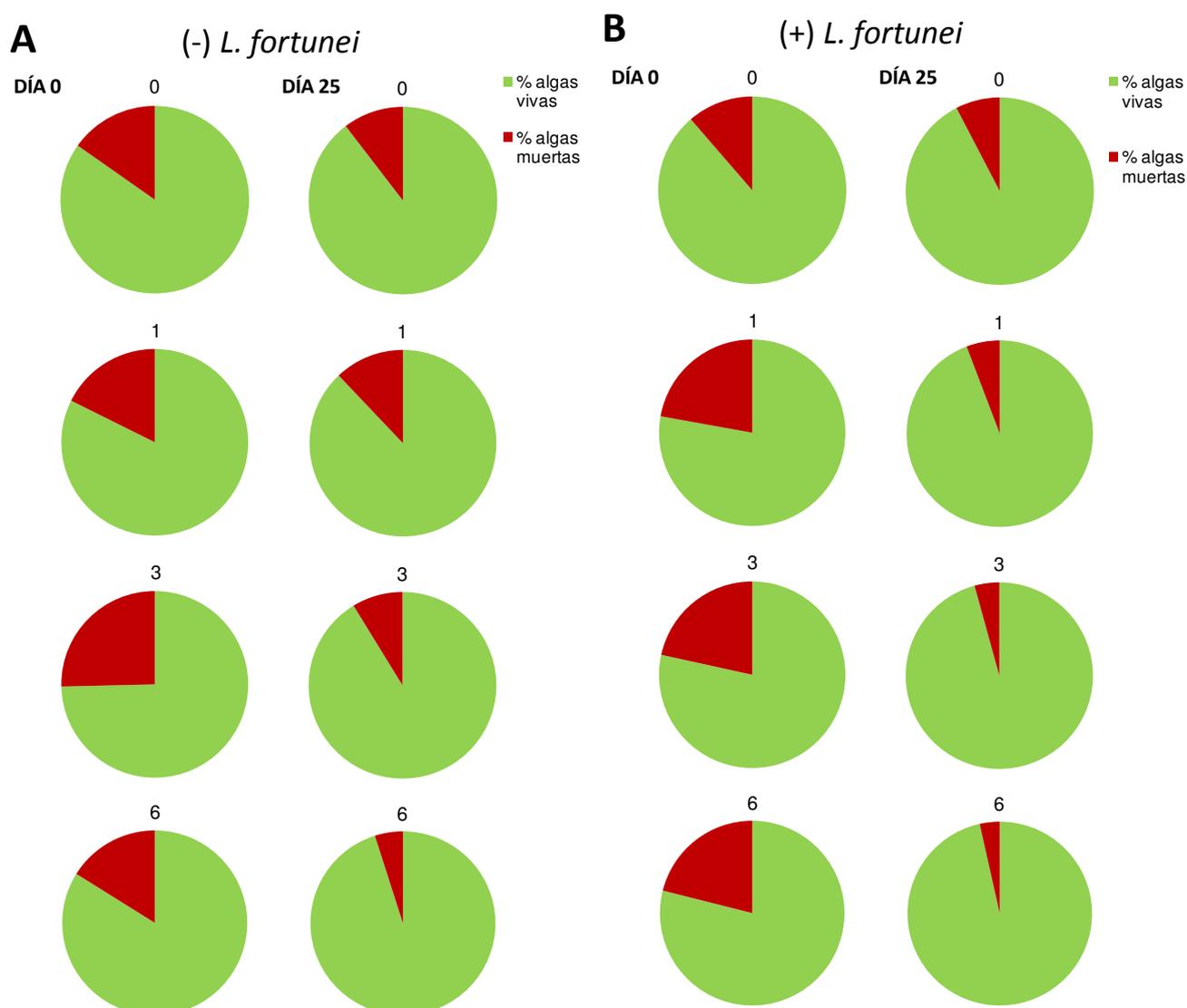
Figuras 65 A y B: principales grupos de algas perifíticas representadas en porcentajes: clorofitas (verde), cianobacterias (azul) y diatomea (amarillo); al comienzo y al final del experimento (días 0 y 25) en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (A) y con (B) *Limnoperna fortunei*.

Resumen: principales grupos algales del perifiton

- Efecto *L. fortunei*: si bien predominaron las clorofitas, en presencia del mejillón el porcentaje de cianobacterias y de diatomeas del perifiton aumentó en el tiempo.
- Efecto glifosato: no hubo efecto glifosato.
- Efecto Interacción: no se observó efecto de la interacción diferente al presentado para el efecto molusco.

(c.ix) Algas vivas vs. algas muertas

Se cuantificó el número de algas vivas y muertas (consideradas como aquellas células vacías y/o rotas), encontrándose individuos muertos de los siguientes grupos: *Staurastrum* spp., diatomeas, dinoflagelados, clorofitas no-filamentosas y clorofitas filamentosas. Se comparó el aporte de la fracción de algas vivas y la fracción de algas muertas (Fig. 66) y se comprobó que en todos los tratamientos hubo una disminución significativa ($p < 0,01$) en el porcentaje de algas muertas del perifiton a tiempo final. Si bien se puede observar que en los tratamientos con presencia de *L. fortunei* el porcentaje de algas muertas al día 25 fue menor que en aquellos tratamientos sin mejillón, estas diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas.



Figuras 66 A y B: porcentaje de algas vivas (verde) y muertas (rojo) al comienzo y al final del experimento (días 0 y 25) en los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (A) y con (B) *Limnoperna fortunei*.

Resumen: algas vivas vs. algas muertas del perifiton

- Efecto *L. fortunei*: existió una tendencia hacia la disminución del porcentaje de algas muertas.
- Efecto Glifosato: se observó una tendencia a un menor porcentaje de algas muertas en tratamientos con glifosato.
- Efecto Interacción: se registró una tendencia a la disminución en el tiempo en el porcentaje de algas muertas en los tratamientos con ambos agentes presentes (**1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf**).

d) Zooplancton*(d.i) Abundancia total*

Debido a que las muestras de zooplancton a tiempo inicial fueron tomadas de los tanques y no de los microcosmos (ver Materiales y Métodos), se obtuvo el promedio formado por tres réplicas, una de cada tanque. En este sentido, asumimos que la distribución de los organismos zooplanctónicos en los microcosmos fue homogénea al momento llenarlos con el agua de cada tanque. Al comenzar el experimento, la concentración inicial del zooplancton total fue semejante entre los tres tanques con promedio de 663 ± 31 individuos por l^{-1} (Fig. 67). A tiempo final, la cantidad de zooplancton total disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en todos los tratamientos respecto a la concentración inicial.

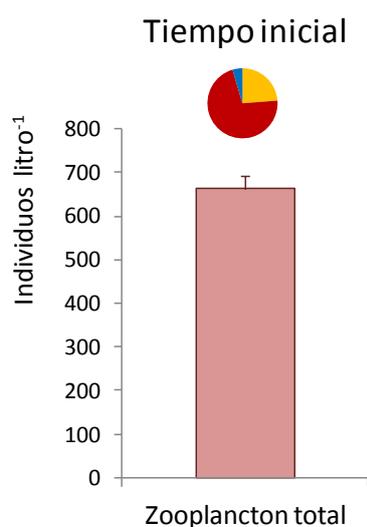


Figura 67: abundancia promedio de zooplancton total (número de individuos l^{-1}) (+ 1 ES) a tiempo inicial (Día 0) en los tanques. En diagrama de torta figura la abundancia relativa de los principales grupos de zooplancton: copépodos (rojo), cladóceros (amarillo) y rotíferos (azul).

Efecto *L. fortunei*: al evaluar el efecto del mejillón sobre el zooplancton (Fig. 68 A) se observó que en presencia de *L. fortunei* el número total de individuos zooplanctónicos a tiempo final fue significativamente mayor que en ausencia de mejillón ($p < 0,05$), con promedios de 156 ± 20 y de 441 ± 194 individuos l^{-1} en los tratamientos **0-Lf** y **0+Lf** respectivamente.

Efecto Glifosato: en los tratamientos que evaluaron el efecto del herbicida (Fig. 68 B) el número de individuos zooplanctónicos fue inferior a 400 individuos l^{-1} . En presencia de glifosato el número aumentó, siendo cada vez mayor con la creciente concentración de herbicida, con promedios de 194 ± 59 ; 276 ± 69 y 367 ± 126 individuos l^{-1} en **1-Lf**, **3-Lf** y **6-Lf** respectivamente.

Efecto Interacción: en los tratamientos con ambos agentes interactuando (Fig. 68 C), la respuesta del zooplancton a tiempo final no fue proporcional a la concentración de glifosato, y presentó una mayor variabilidad entre réplicas respecto a los tratamientos con los factores por separado. Tanto en el tratamiento con la menor dosis de glifosato como en aquél con la dosis media (**1+Lf** y **3+Lf**), el número total de organismos zooplanctónicos fue superior a 400 individuos l^{-1} , con promedios de 480 ± 85 y 420 ± 164 individuos l^{-1} para **1+Lf** y **3+Lf** respectivamente. En la concentración más alta de glifosato (**6+Lf**), la cantidad de zooplancton fue menor, con promedio de 277 ± 11 individuos l^{-1} .

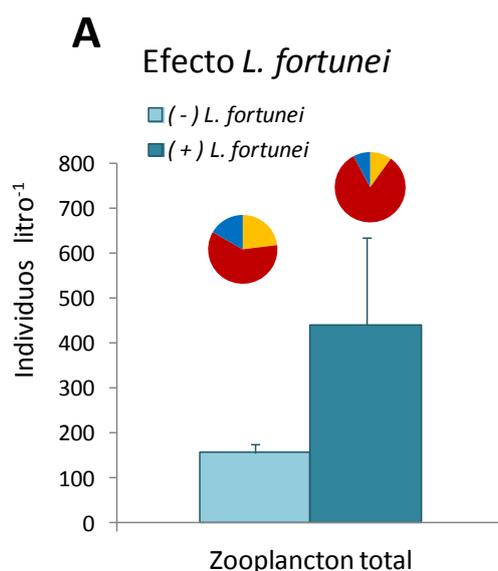
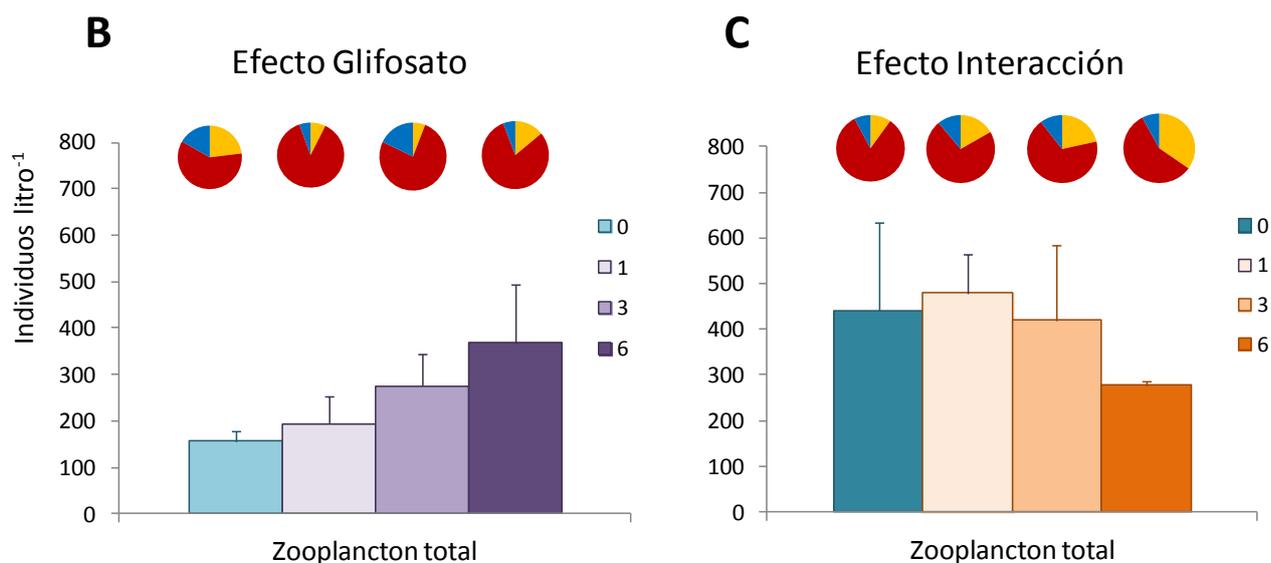


Figura 68 A: abundancia promedio de zooplancton total (número de individuos l^{-1}) (+ 1 ES) a tiempo final (Día 25) en los tratamientos sin glifosato, sin (- L.f.) y con (+ L.f.) *Limnoperna fortunei*. En diagrama de torta se indica la abundancia relativa de los principales grupos de zooplancton: copépodos (rojo), cladóceros (amarillo) y rotíferos (azul).



Figuras 68 B y C: abundancia promedio de zooplancton total (número de individuos l⁻¹) (+ 1 ES) a tiempo final (Día 25) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*. En diagrama de torta se indica la abundancia relativa de los principales grupos de zooplancton: copépodos (rojo), cladóceros (amarillo) y rotíferos (azul).

Resumen: Zooplancton total

- Efecto *L. fortunei*: a tiempo final en presencia de mejillón la concentración de zooplancton fue significativamente mayor que sin mejillón.
- Efecto Glifosato: a tiempo final se observó una tendencia a una mayor abundancia de zooplancton a mayores concentraciones de herbicida.
- Efecto Interacción: no se pudo detectar un claro efecto de ambos agentes sobre la concentración de zooplancton en la columna de agua.

(d.ii) Abundancia relativa

En las muestras analizadas se encontraron representantes de los tres principales grupos taxonómicos de zooplancton: cladóceros, copépodos y rotíferos. En el grupo de los cladóceros se hallaron organismos pertenecientes a las familias Chydoridae, Sididae y Macrothricidae. Dentro del grupo de los copépodos se observaron individuos adultos como también larvas nauplii de las familias Calanoida y Cyclopoida. Los rotíferos por su parte, fueron los que presentaron más diversidad, encontrándose en las muestras analizadas por lo menos uno de los siguientes géneros: *Asplanchna* spp., *Brachionus* spp., *Cephalodella* spp., *Colurella* sp., *Euchlanis* spp., *Gyratrix* spp., *Hexarthra* spp., *Keratella* spp., *Lecane* spp., *Lepadella* spp., *Mytilina* spp., *Plationus* spp., *Platyias* spp., *Polyarthra* spp., *Testudinella* spp., *Trichocerca* spp., *Trichotria* spp. y *Wolga* spp., como

también algunos representantes de la familia Notommatidae y otros de la clase Bdelloidea.

En la Fig. 68 se observa la abundancia relativa de los tres grupos más importantes del zooplancton para cada tratamiento. En todos los tratamientos el zooplancton se encontró dominado por los copépodos. A tiempo inicial las abundancias relativas fueron de $72 \pm 5 \%$, $23 \pm 4 \%$ y $5 \pm 2 \%$ de copépodos, cladóceros y rotíferos respectivamente, mientras que a tiempo final el zooplancton se encontró en todos los tratamientos dominado por los copépodos con porcentajes en promedio entre 57 y 87%. Si bien los copépodos (adultos y larvas) fueron el grupo más abundante, entre el tiempo inicial y el tiempo final la abundancia total de copépodos disminuyó significativamente ($p < 0,05$) de un promedio (\pm ES) de 475 ± 24 a 321 ± 59 copépodos l^{-1} , a la vez que también se vio reducido a significativamente el número de total de cladóceros de 158 ± 39 a 53 ± 11 cladóceros l^{-1} . Los rotíferos en cambio se mantuvieron relativamente estables en su abundancia total, con una concentración inicial promedio de 30 ± 10 rotíferos por litro, a una de 32 ± 5 individuos l^{-1} .

Efecto *L. fortunei*: a tiempo final la abundancia total del zooplancton fue mayor en los tratamientos con mejillón, viéndose favorecido el grupo de los copépodos que aumentó su abundancia relativa respecto al tratamiento sin mejillón, en detrimento de los otros dos grupos, los cladóceros y los rotíferos. En ausencia de *Limnoperna fortunei*, el promedio del aporte de cada grupo al zooplancton total fue de $60 \pm 13 \%$; $23 \pm 7 \%$ y $17 \pm 6 \%$ de copépodos, cladóceros y rotíferos respectivamente (Fig. 68 A). En el tratamiento con mejillón el porcentaje de copépodos ascendió a $82 \pm 4 \%$, mientras que la abundancia relativa de cladóceros y rotíferos disminuyó a un $10 \pm 4 \%$ y $8 \pm 2 \%$ respectivamente.

Efecto Glifosato: en los tratamientos que evaluaron el efecto del herbicida se observó una tendencia al aumento de la abundancia zooplanctónica con la creciente dosis de glifosato. En cuanto a las abundancias relativas de los grupos más importantes de zooplancton se observó que en todos los tratamientos con herbicida el porcentaje de copépodos fue mayor, siendo de $60 \pm 13 \%$ en **0-Lf** y de $87 \pm 1 \%$, $76 \pm 8 \%$ y $80 \pm 8 \%$ en los tratamientos **1-Lf**, **3-Lf** y **6-Lf** respectivamente (Fig. 68 B). En cuanto a los grupos subdominantes, no se identificó algún patrón en particular respecto al efecto del herbicida.

Efecto Interacción: nuevamente los copépodos fueron dominantes con promedios de abundancia relativa de $72 \pm 6 \%$, $68 \pm 6 \%$ y $57 \pm 20 \%$ en **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente, y se observó un patrón en la abundancia relativa de los grupos subdominantes (Fig. 68 C). La proporción de rotíferos se mantuvo relativamente constante en todas las concentraciones de glifosato con porcentajes promedios entre 8-11% mientras que la de cladóceros fue mayor en presencia de mejillón ($p < 0,05$), gradualmente aumentando a mayores dosis de herbicida, con promedios de 16, 24 y 33% para los tratamientos **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente. Es importante tener en cuenta que a tiempo final la concentración de glifosato se vio significativamente disminuida en presencia de mejillón, y por lo tanto en todos los tratamientos con mejillón al día 25 la concentración de glifosato fue inferior a 1 mg l^{-1} .

Resumen: Abundancia relativa del zooplancton

- Efecto *L. fortunei*: a tiempo final se observó un mayor porcentaje en la abundancia relativa de los copépodos en presencia de *L. fortunei*.
- Efecto Glifosato: si bien en todos los tratamientos con glifosato se observó una mayor proporción de copépodos, no se observó un claro efecto del herbicida sobre los grupos subdominantes.
- Efecto Interacción: en presencia de herbicida y mejillón se observó una tendencia a un aumento en la abundancia relativa de los cladóceros, siendo esta mayor para mayores dosis de glifosato y significativamente superior a los mismos tratamientos que evaluaron el efecto glifosato.

(d.iii) Copépodos

Se analizó con mayor grado de detalle al grupo de los copépodos puesto que fue dominante en todas las muestras analizadas. A tiempo inicial, el número total de copépodos en los tanques de acuicultura resultó ser de $475 \pm 24 \text{ individuos l}^{-1}$, de los cuales el 93% estuvo representado por larvas nauplii (Fig. 69). A tiempo final, el número de copépodos adultos disminuyó significativamente desde un promedio inicial de 30 a 18 adultos l^{-1} . Las larvas nauplii también sufrieron una reducción a la mitad de su abundancia entre el tiempo inicial y el final, de un promedio de (445 a 222 larvas l^{-1}), pero igualmente siguieron siendo dominantes y con abundancia relativa

significativamente mayor que la de los adultos ($p < 0,01$) en todos los tratamientos, siempre superior al 70% del total de copépodos.

Efecto *L. fortunei*: en presencia de mejillón la abundancia de copépodos resultó ser significativamente mayor ($p < 0,05$) que en el tratamiento sin mejillón, debido a un aumento en el número de larvas nauplii (Fig. 70 A).

Efecto Glifosato: a tiempo final el número total de copépodos ascendió gradualmente con la creciente concentración de glifosato debido a un aumento en el número de larvas nauplii de copépodos (Fig. 70 B). Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Efecto Interacción: en los tratamientos que evaluaron la interacción (Fig. 70 C) la tendencia en el número total de copépodos fue opuesta a lo observado para el efecto glifosato, siendo máxima en el tratamiento sin herbicida, y decreciendo gradualmente a mayores concentraciones de glifosato debido principalmente a una disminución en el número de larvas nauplii. No obstante, se observó un pequeño incremento (en particular en **3+Lf** y **6+Lf**) en la abundancia de los copépodos adultos. A pesar de estas tendencias que pudimos observar, no se detectaron diferencias significativas en el número de larvas nauplii en los distintos tratamientos.

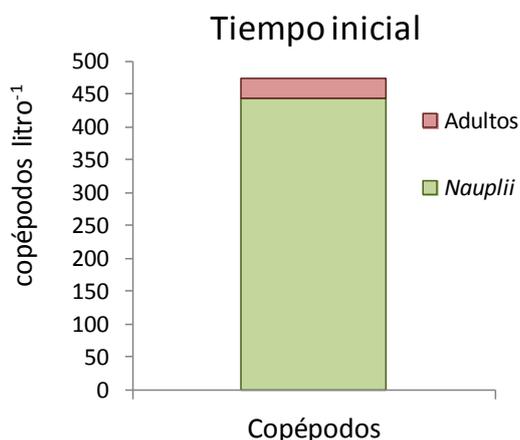
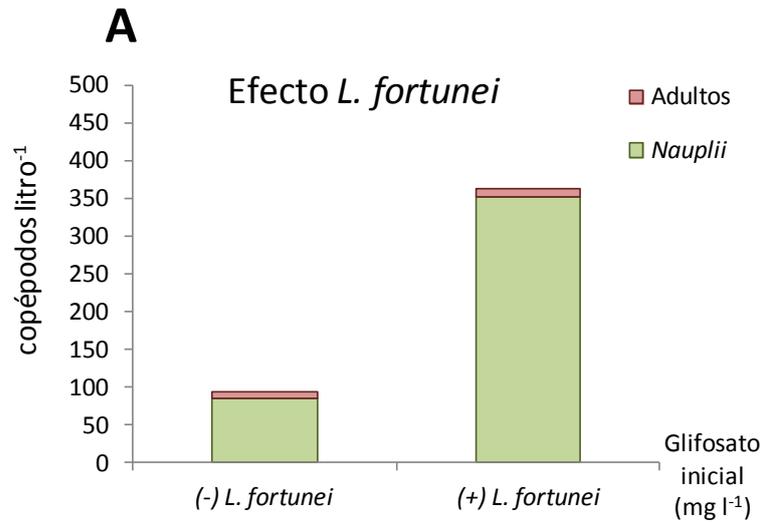
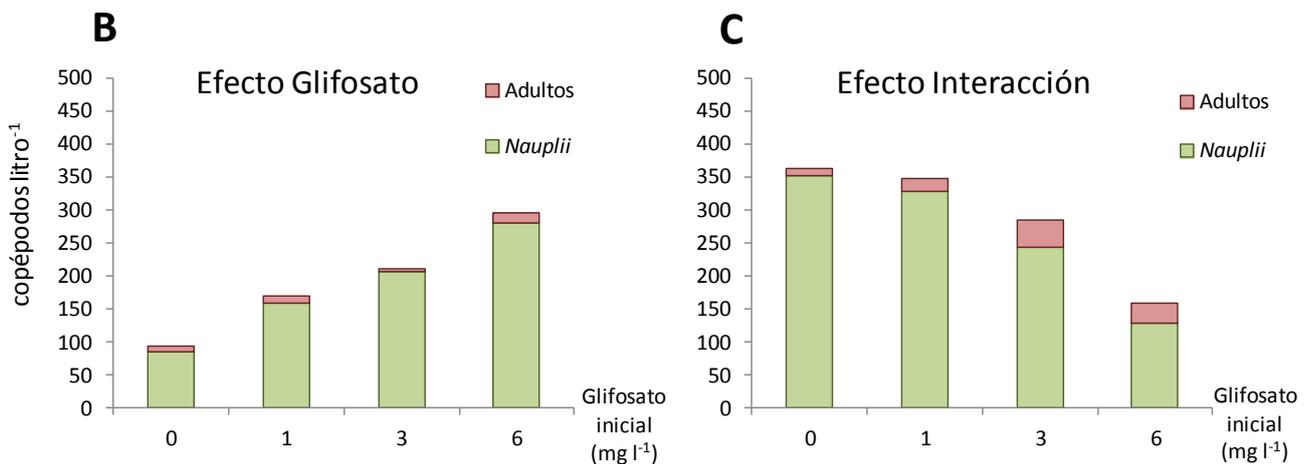


Figura 69: abundancia total promedio de copépodos (número de individuos l^{-1}) dividida en adultos (rosa) y larvas nauplii (verde) a tiempo inicial (Día 0) en los tanques.



Figuras 70 A: copéodos totales promedio (número de individuos l⁻¹) separados en adultos (rosa) y larvas nauplii (verde) a tiempo final (Día 25) para los tratamientos sin glifosato, sin (-) y con (+) *Limnopena fortunei*.



Figuras 70 B y C: copéodos totales promedio (número de individuos l⁻¹) separados en adultos (rosa) y larvas nauplii (verde) a tiempo final (Día 25) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnopena fortunei*.

Resumen: Copéodos

- Efecto *L. fortunei*: en presencia de mejillón el número de larvas nauplii a tiempo final resultó significativamente mayor.
- Efecto Glifosato: a mayor concentración de glifosato, mayor resultó la abundancia de larvas nauplii a tiempo final, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas.
- Efecto Interacción: en presencia de ambos agentes, la abundancia total de copéodos disminuyó a mayor concentración del herbicida, así como también se redujo la proporción de larvas nauplii.

iv) Resumen general

A modo de resumen se incluye a continuación la siguiente Tabla (Tabla 9) con los efectos más importantes del glifosato y el mejillón *L. fortunei* sobre las variables analizadas.

Variable	Efecto <i>Limoperna fortunei</i>	Efecto Glifosato	Efecto Interacción
Glifosato disuelto	↑ tasa de disipación del glifosato en agua		
Fisico-Químicas	Afecta la concentración de oxígeno disuelto ↑ pH ↓ Conductividad	↑ pH	
Nutrientes	↑ Nitrógeno total a la 2da semana ↑ Amonio durante las primeras 24 hs	↑ fósforo en la columna de agua	↓ Fósforo total en las dosis más altas de glifosato Efecto sinérgico sobre el nitrógeno total y el fósforo reactivo soluble.
Sólidos en suspensión & Turbidez	↑ Sólidos en suspensión en ausencia de mejillón ↓ inicial y posterior ↑ en la turbidez del agua		↑ Turbidez a partir de la 2da semana
Biológicas: Bacterioplancton			↑ bacterioplancton
Biológicas: Fitoplancton	↓ inicial y posterior ↑ de clorofila- <i>a</i> fitoplanctónica ↓ la abundancia del fitoplancton Alteración de la abundancia relativa de los principales grupos algales ↑ diversidad de grupos algales a tiempo final ↓ el porcentaje de algas muertas	La disminución en el número de algas fue más lenta en tratamientos con glifosato	
Biológicas: Perifiton	↑ clorofila- <i>a</i> del perifiton a partir del día 7. ↓ índice autotrófico	↓ clorofila- <i>a</i> ↓ índice autotrófico.	↓ clorofila- <i>a</i> ↓ porcentaje de algas filamentosas.

Sección II: Resultados

<p>Biológicas: Perifiton</p>	<p>↑ porcentaje de algas filamentosas</p> <p>↑ porcentaje de diatomeas y cianobacterias</p> <p>↘ en porcentaje de algas muertas</p>	<p>↘ porcentaje de algas muertas</p>	<p>↘ porcentaje de algas muertas</p>
<p>Biológicas: Zooplancton</p>	<p>↑ abundancia del zooplancton</p> <p>↑ porcentaje de copépodos</p> <p>↑ en abundancia de larvas nauplii a tiempo final</p>	<p>↘ abundancia de zooplancton a mayores concentraciones de herbicida</p> <p>↘ de larvas nauplii a tiempo final</p>	<p>↘ porcentaje de los cladóceros a mayores dosis de herbicida</p> <p>↘ abundancias de copépodos y larvas nauplii a mayores dosis de herbicida</p>

Tabla 9: resumen del efecto de los agentes de cambio ambiental (glifosato y *Limnoperna fortunei*) por separado y en conjunto sobre las variables físico-químicas y biológicas analizadas en cuerpos de agua dulce experimentales. Las flechas verticales indican aumentos y disminuciones, y las diagonales tendencias.

Discusión

El mejillón dorado *Limnoperna fortunei* aceleró la disipación del glifosato disuelto en agua de características naturales debido posiblemente tanto a la actividad filtradora de los mismos, como por la degradación por parte de los microorganismos del biofilm de las valvas (como fuera ya observado en la sección I de la presente tesis). En este experimento, simulando escenarios más realistas, pudimos demostrar que el molusco activamente afecta la vida media del glifosato. En los microcosmos a la intemperie y en presencia de mejillón, la vida media del glifosato se vio drásticamente reducida en casi 4 veces (de 33,4 días a 8,7 días). En este punto, se pone en evidencia cómo una agente de cambio, *Limnoperna fortunei*, afecta directamente a otro agente de cambio, el glifosato, en un ambiente natural.

La evolución aislada del herbicida en agua muestra que la concentración de glifosato disuelto se vio reducida en todos los tratamientos durante el período experimental. Inicialmente, durante las primeras 24 h experimentales, es posible que la disipación de glifosato se haya debido a su adsorción a los sólidos en suspensión y a las paredes de los microcosmos. Posteriormente pudo haber ocurrido un proceso de degradación, tanto por actividad microbiana, como por fotólisis con luz UV (Trinelli *et al.* 2012), como también pudo haberse dado la incorporación del herbicida en la biomasa de algas y microorganismos del sistema. Mientras que en los ensayos de laboratorio la persistencia del glifosato disuelto fue alta, indicando que ambientes cerrados con pocos microorganismos enlentecen la degradación del herbicida, en microcosmos a la intemperie la vida media fue significativamente menor. Los experimentos a mayor escala, expuestos a las variaciones y a la interacción con el ambiente, cobran real importancia a la hora de entender la evolución de un contaminante en condiciones naturales. Como ha sido indicado anteriormente, la vida media del glifosato en ecosistemas de agua dulce se estima que varía en un rango entre 7 y 70 días dependiendo de las condiciones del ambiente (Giesy *et al.* 2000). En experimentos previos en meso y microcosmos a la intemperie representativos de lagunas someras de la pampa húmeda argentina, la vida media del glifosato se

encontró entre 4 y 16 días (Pérez *et al.* 2007, Vera *et al.* 2010 y 2012). En nuestro experimento (en ausencia de *L. fortunei*) la persistencia del herbicida resultó mayor a dicho rango, tal vez debido a diferencias en la calidad y las características del glifosato utilizado, así como también a las características del agua, siendo menos alcalinas las utilizadas en nuestra experiencia respecto del agua de pozo de la zona de Chascomús (Prov. de Bs As) utilizado en trabajos previos (Pérez *et al.* y Vera *et al.* op cit.) con un pH entre 8,8 y 9,3. Asimismo, en el presente experimento usamos glifosato ácido en grado técnico (95% puro), mientras que los experimentos reportados utilizaron formulados a base de glifosato en forma de sal (Glifosato Atanor®, en Vera *et al.* 2012 y Roundup®, en Pérez *et al.* 2007 y Vera *et al.* 2010). Existen diversos factores de los ecosistemas lénticos que pueden afectar la persistencia del glifosato en la columna de agua (Barja *et al.* 2001, Goldsborough y Beck 1989), tanto las características físico-químicas como la temperatura y el pH del agua, la concentración de sólidos en suspensión y la presencia de sedimentos; así como biológicas, relacionadas con la composición y características generales de los organismos que los habitan. Asimismo, la presencia de fosfatos en el agua reduce la capacidad del sistema en adsorber glifosato puesto que el fosfato compite con el glifosato por los mismos sitios de adsorción (Gimsing *et al.* 2002). En sistemas con una mayor concentración de fósforo en forma disuelta se reduce la adsorción del herbicida, lo que a la larga facilita su biodisponibilidad para la degradación microbiana. En este sentido, los altos valores iniciales de fosfatos en nuestro experimento ($0,01 \text{ mg l}^{-1}$) de casi un orden de magnitud mayor respecto a los reportados en Vera *et al.* 2010 y 2012 estarían reduciendo la capacidad del sistema de adsorber el glifosato, explicando en parte su mayor permanencia en la columna de agua.

En cuanto a las características físico-químicas del agua (pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura), si bien se registró efecto de los agentes por separado en las variables estudiadas (excepto para la temperatura del agua), no hubo efecto de la interacción del glifosato y *Limnoperna fortunei*. El patrón de temperatura encontrado en todos los microcosmos se correspondió a las variaciones temporales según la época del año y al no existir diferencias entre unidades experimentales, nos aseguró una situación homogénea entre tratamientos. La variación diurna de temperaturas

registradas con la medición continua de temperatura (THERMO buttons) durante los primeros 5 días experimentales demuestran que los microcosmos a la intemperie funcionaron como verdaderos sistemas lénticos de pequeño tamaño. En presencia de *L. fortunei*, se registró un aumento significativo en el pH, una menor conductividad y una mayor concentración de oxígeno disuelto a tiempo final. El aumento en el oxígeno disuelto y la alcalinización del agua sugieren la existencia de una comunidad autótrofa más desarrollada en presencia de mejillón, que será discutido en mayor profundidad más adelante. Asimismo, la actividad filtradora de *L. fortunei* facilitó la oxigenación del agua como ya fuera documentado por Karatayev *et al.* (2006) y redujo la concentración de material suspendido y disuelto en la columna de agua, por su alta tasa de clareado (Sylvester *et al.* 2005), disminuyendo la conductividad respecto a los tratamientos sin mejillón. Por su parte, debido a la disociación ácido-base de la molécula de glifosato, cuyas constantes y equilibrios (Barja y dos Santos Afonso 1998) se indican en la Introducción General, se espera que en el medio acuoso el herbicida produzca una disminución en el pH del sistema. Sin embargo, a pesar de haber sido suministrado en forma ácida, se registró un aumento del pH en tratamientos con agregado de glifosato, en consistencia con lo registrado por Vera *et al.* (2012) en microcosmos adicionados con 3,5 mg l⁻¹ de glifosato. La alcalinización del agua en tratamientos con glifosato también sugiere un mayor desarrollo de actividad fotosintética respecto a la respiración en el sistema, generada indirectamente por el agregado del herbicida.

Como fuera observado en experimentos en mesocosmos por Cataldo *et al.* (2012b), el fósforo total (TP) no sufrió modificaciones causadas exclusivamente por *Limnoperna fortunei*. Si bien la actividad filtradora del mejillón produce excreción de fósforo en la forma soluble, el mejillón *per se* no generó aumento en el PT, indicando que no aportó fósforo de origen externo al sistema (i.e. alimentación previa al experimento). El agregado de glifosato, en cambio, provocó un aumento de PT en la columna de agua, en coincidencia con lo reportado en trabajos previos (Austin *et al.* 1991, Pérez *et al.* 2007, Vera *et al.* 2010 y 2012), por poseer su molécula un grupo fosfonato. No obstante, el PT cuantificado al día 1 en la columna de agua fue levemente menor a aquél esperado a partir de la dosis de glifosato suministrada, lo que podría significar, como fuera ya estipulado, que durante las primeras 24 h parte del glifosato (entre un

25-36%) estaría siendo adsorbido a alguna superficie en el sistema (e.g. biofilm de las valvas, sólidos en suspensión, etc), o siendo incorporado a la biomasa de las algas y de los moluscos. Por otro lado, se detectó un efecto de la interacción del mejillón y del glifosato sobre la variación del PT en la columna de agua a tiempo final (del 23,5% y 46,5% en **3+Lf** y **6+Lf** respectivamente) lo que sugiere una retención de parte del fósforo o bien por la actividad metabólica de los mejillones, o bien como parte de los autótrofos, principalmente del metafiton que tuvo un mayor desarrollo en presencia de *L. fortunei*. Este punto será discutido más adelante en esta sección.

El fósforo reactivo soluble (PRS) no se vio afectado por el agregado de glifosato, en coincidencia con lo observado por otros autores en experimentos al aire libre (Pérez *et al.* 2007, Vera *et al.* 2010 y 2012). Asimismo, y a diferencia de lo registrado en la Sección I de esta tesis (Segunda etapa, b.ii), no hubo efecto de *Limnoperna fortunei* sobre la concentración de PRS, indicando posiblemente su consumo por parte de microorganismos del sistema. Entre los microorganismos analizados se observó un crecimiento explosivo de metafiton solo en aquellas unidades experimentales con presencia de *L. fortunei*. En este sentido, en dichos tratamientos, el metafiton estaría asimilando el PRS a una tasa tal que enmascaró la liberación del PRS del mejillón dorado. Cataldo *et al.* (2012b) en experimento en mesocosmos llevado a cabo en un cuerpo de agua natural (Embalse de Río Tercero) encontraron que la presencia de *L. fortunei* generó un aumento significativo del PRS a las 24 hs de 0,9 a 13,1 $\mu\text{g l}^{-1}$. Asimismo, en otro experimento realizado en mesocosmos en el Embalse de Salto Grande, y a mayor escala temporal (35 días), Cataldo *et al.* (2012a) también registraron un aumento significativo del PRS en tratamientos con *L. fortunei* (hasta 40 $\mu\text{g l}^{-1}$) respecto al control sin mejillón. En ambos experimentos probablemente la abundancia y actividad de la comunidad autótrofa del sistema presentara una tasa de consumo del PRS menor, registrándose su aumento en la columna de agua en presencia del mejillón.

Otro de los resultados más relevantes de esta sección tiene que ver con el efecto sinérgico del glifosato y *Limnoperna fortunei* sobre el PRS en la columna de agua. El molusco acelera la degradación del glifosato en el agua observándose claramente que a mayor dosis de herbicida, mayor resultó el aporte de PRS al agua en presencia de *L. fortunei*. Estos resultados tienen implicancias ecológicas muy importantes puesto que el glifosato no solo genera un aumento en el PT del sistema sino que al interactuar con

L. fortunei, parte de este fósforo suministrado por el herbicida se vuelve biodisponible como PRS para ser incorporado, acelerando y facilitando el desarrollo de microorganismos (i.e. algas y bacterias) que utilizan dicho nutriente.

El nitrógeno total (NT) se encontró en todos los tratamientos en altas concentraciones. La presencia de mejillones aportó nitrógeno a la columna de agua en forma de amonio, producto de su metabolismo como fuera observado por Cataldo *et al.* (2012a y 2012b), sin embargo este aporte no generó una diferencia en el NT, indicando que *L. fortunei* recicla el nitrógeno del sistema sin alterar significativamente aquél en la columna de agua. El aumento significativo de NT con respecto al control a las dos semanas, podría deberse a un aporte externo (e.g. animales, hojarasca, etc.) o bien de organismos de otros compartimentos ecológicos del sistema. Específicamente en el perifiton nosotros registramos en tratamientos con mejillón un mayor desarrollo de cianobacterias filamentosas del género *Nostoc*, que poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Allen y Arnon 1955), lo que podría estar explicando el aumento registrado en el nitrógeno total. A tiempo final, la disminución en los nutrientes totales, tanto el NT como también en el PT, estarían indicando la incorporación de estos en la biomasa de organismos no presentes en la columna de agua, particularmente por el metafiton que presentó un muy marcado desarrollo en presencia de *L. fortunei*.

En términos generales, los procesos fisiológicos algales requieren una relación entre el nitrógeno total y el fósforo total (N:P) cercana a 16 (Redfield 1934). Si bien este valor varía entre especies, es una proporción relativamente conservada entre organismos planctónicos. La relación N:P del sistema puede sugerir limitación por nutrientes para el crecimiento algal, siendo valores altos de N:P indicadores de limitación de P, mientras que valores bajos indicarían limitación por N (Borchardt 1996, Koerselman y Meuleman 1996). Según Downing y McCauley (1992), la relación N:P en lagos y lagunas puede variar entre 200 y valores menores a 1 debido a diferentes procesos físico-químicos y biológicos del sistema. Asimismo, Downing y McCauley (*op. cit*) indican que la relación entre el nitrógeno total y el fósforo total de un cuerpo de agua está asociado al estado trófico del sistema, siendo los cuerpos oligotróficos caracterizados por altos valores de N:P, mientras que valores muy bajos indican sistemas con mayor nivel trófico. Adicionalmente, dicho autor indica que la relación

N:P es un reflejo de la fuente del aporte de los nutrientes; cuando el aporte es de una cuenca natural, lluvias o aguas subterráneas, que por lo general tienen mayores concentraciones de N que de P, la relación N:P es alta (entre 20 y >200) y por lo tanto el cuerpo de agua receptor tiende a ser oligotrófico. Si en cambio la fuente de nutrientes proviene del escurrimiento de agua de tierras alteradas por el uso de fertilizantes y agroquímicos, como también ocurre con el aporte de aguas residuales urbanas, donde hay más concentración de P que de N, entonces la relación N:P será baja (entre 10 y <1), tendiendo a eutrofizar los cuerpos de agua receptores (Downing y McCauley 1992). En función de nuestros resultados, se calculó la relación N:P en los tratamientos a lo largo del tiempo (Fig. 71). Se observó que la presencia de *Limnoperna fortunei*, en los microcosmos sin agregado de herbicida provocó un aumento en la relación N:P del sistema a la segunda semana, debido por un lado al aumento en el nitrógeno total por aporte de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno en el perifiton, estimuladas en presencia del mejillón, mientras que el crecimiento exponencial del metafiton asimiló el PRS excretado por el molusco invasor (Fig. 71 A). Contrariamente, a tiempo final *L. fortunei* generó una relación N:P significativamente menor ($p < 0,05$) respecto al tratamiento control, debido posiblemente a la incorporación de nutrientes por el metafiton. Por otra parte en las unidades experimentales conteniendo el herbicida con y sin la presencia del molusco invasor el aumento en el fósforo total dado por el glifosato generó una disminución significativa ($p < 0,05$) de N:P desde valores cercanos a 70 a valores menores a 20 (Fig. 71 B y C).

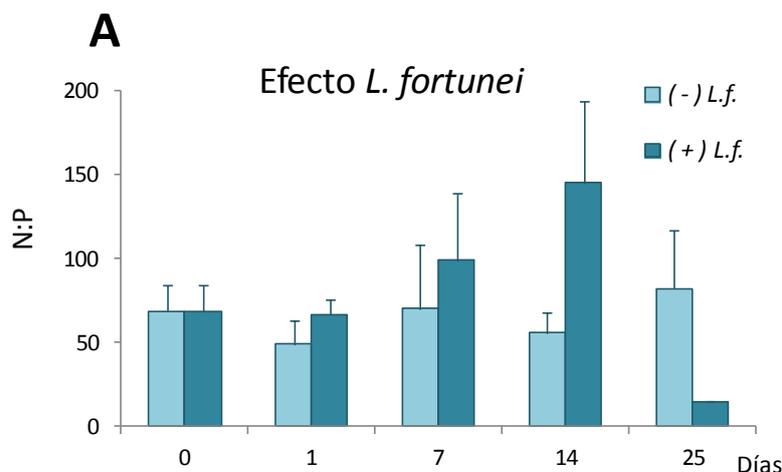
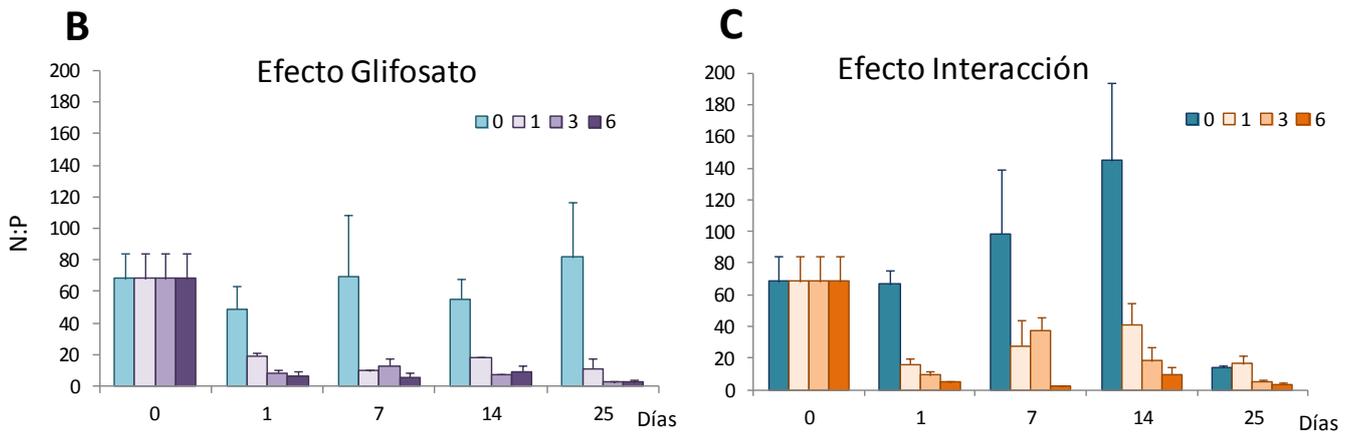


Figura 71 A: relación entre el nitrógeno total y el fósforo total (N:P) en la columna de agua (promedio \pm ES) en los tratamientos sin glifosato, sin (- *L.f.*) y con (+ *L.f.*) *Limnoperna fortunei* durante el período experimental.



Figuras 71 B y C: relación entre el nitrógeno total y el fósforo total (N:P) en la columna de agua (promedio \pm ES) para los tratamientos con 0, 1, 3 y 6 mg l⁻¹ de glifosato, sin (B) y con (C) *Limnoperna fortunei*, durante el período experimental (barra: + 1 ES).

En presencia del mejillón (**0+Lf**, **1+Lf**, **3+Lf** y **6+Lf**) y a partir del día 14 se desarrolló una comunidad muy conspicua de **metafiton** que se comenzó a evidenciar por la observación de matas filamentosas en los microcosmos. El desarrollo del metafiton se ve favorecido en sistemas con una baja relación N:P, aguas someras y poco turbulentas, alta concentración de nutrientes, alcalinidad y alta irradiancia lumínica (Goldsborough y Robinson 1996). Nuestros microcosmos fueron propicios para el desarrollo de algas del metafiton puesto que el experimento fue llevado a cabo durante el verano con alta radiación solar, las características del agua fueron mesoeutróficas a eutróficas, y aguas alcalinas. Si bien el aporte de P por parte del glifosato generó una disminución en la relación N:P, el metafiton se vio particularmente favorecido para su desarrollo en microcosmos con *L. fortunei* debido posiblemente al aporte de nutrientes por parte del mejillón, en especial fósforo. Además, y como factor clave, tanto los perifitómetros como las jaulas contenedoras de los moluscos, funcionaron como excelentes soportes que facilitaron el desarrollo de estas algas. Como fue descrito por otros autores (Cataldo *et al.* 2012b, Frau *et al.* 2012) la actividad de *Limnoperna fortunei* afecta la disponibilidad de nutrientes en la columna de agua. Cataldo *et al.* (op. cit) observaron en experimentos en mesocosmos (400 l) en un embalse natural, que a las 24 h el mejillón había removido el 49% del fósforo total y el 84% del nitrógeno particulado de la columna de agua, excretando amonio y fósforo. Dichos autores compararon las tasas

de mineralización con la de otros bivalvos, encontrando que existe una alta variabilidad que depende principalmente de la edad, el tamaño y el metabolismo de los moluscos.

Los sólidos en suspensión y la turbidez resultaron altamente variables entre tratamientos, debido posiblemente al tipo de dispositivos –microcosmos al aire libre– que utilizamos en este ensayo. En experimentos a la intemperie, el aporte de material arrastrado por el viento, la dilución por lluvias y otro tipo de interacción como la que puede suceder con aves e insectos, son algunos de los agentes que pudieron haber influido en nuestro trabajo de manera diferencial en cada microcosmos evaluado. En experimentos de este tipo, donde el mayor realismo que el diseño experimental implica conlleva una mayor variabilidad entre réplicas, el estudio de las tendencias registradas de los resultados cobra gran significancia. En este sentido, se observó que en ausencia de herbicida, existió una marcada tendencia por parte del mejillón a disminuir la turbidez, indicando que su actividad filtradora redujo los sólidos en suspensión en la columna de agua, como fuera observado por Boltovskoy *et al.* (2009a) y Sylvester *et al.* (2005). Si bien el glifosato no generó un efecto sobre el seston en coincidencia con lo observado por Pérez *et al.* (2007), tampoco afectó la turbidez del agua, a diferencia de lo esperado de acuerdo la tendencia observada en experimentos en microcosmos (90 l) por Vera *et al.* 2012 con el agregado de 3,5 mg l⁻¹ de glifosato. Asimismo, Vera *et al.* (2010) observaron que una sola aplicación de glifosato en mesocosmos a la intemperie representativos de cuerpos de agua someros alcanzó para modificar los sistemas de un estado de aguas claras a un estado turbio luego de un año de la aplicación. Por otro lado, registramos una respuesta sinérgica tanto en el seston (para **1+Lf** y **3+Lf**) como en la turbidez del agua en los tratamientos con ambos agentes. Si bien inicialmente se vio un clareado y una mayor transparencia del agua debido a la actividad filtradora del mejillón, a lo largo del experimento se observó un aumento de la turbidez. Creemos que el desarrollo del metafiton registrado en los tratamientos que evaluaron el efecto de la interacción pudo haber aumentado la turbidez del sistema puesto que, además de formar matas filamentosas macroscópicas, parte de estos filamentos pudieron desprenderse, pasando a formar parte de la columna de agua. Adicionalmente, es posible que el metafiton que estuviera todavía retenido a un sustrato (i.e. perifitómetros) haya generado una suerte de trampa de nutrientes,

facilitando su retención y alterando entonces los sólidos en suspensión y la turbidez del sistema, aumentando la variabilidad entre réplicas. La turbidez es considerada una buena medida de la calidad del agua, siendo valoradas las aguas más claras como de mayor calidad. De acuerdo a la turbidez, **la interacción del glifosato y *L. fortunei* deterioró la calidad del agua.**

Limnoperna fortunei modificó la concentración de clorofila-*a* (Chl-*a*) de la columna de agua, generando una disminución inicial debido a su alta tasa filtradora, como fuera observado en ambientes naturales por diversos autores (Rojas Molina y José de Paggi (2008, Cataldo *et al.* 2012a y 2012b). Posteriormente el tratamiento con mejillón presentó un aumento significativo que se hizo máximo a las dos semanas de la experiencia, sin embargo este incremento no puede ser explicado por la presencia de algas fitoplanctónicas ya que estas permanecieron en valores muy bajos (< 5000 células ml⁻¹) hasta el final del ensayo (Fig. 44 A). La mayor disponibilidad de nutrientes a partir de la mineralización producida por el metabolismo del molusco invasor además de estimular el desarrollo de la fracción autotrófica del perifiton (Fig. 53 A) produjo un abrupto incremento de algas tipo zygnematales del metafiton. Estas algas filamentosas al desprenderse del sustrato no fueron ingeridas por el mejillón debido a su gran tamaño y a diferencia de resto de las algas fitoplanctónicas se desarrollan en la columna del agua sin ser diezmadas por predación, siendo el metafiton el principal responsable del aumento de la clorofila *a* observado a partir de la primera semana de experiencia. Por otro lado, no se observó un efecto del glifosato sobre la Chl-*a* de la columna de agua, a diferencia de lo encontrado por Vera *et al.* (2012) que registraron un aumento de la concentración del pigmento en tratamientos con adición de Glifosato Atanor®. Nosotros postulamos que la aparición y desarrollo del metafiton provocó este cambio en los resultados esperados. El efecto competitivo, tanto por nutrientes como por la luz, alteró el desarrollo del fitoplancton, reduciendo su densidad.

La tendencia de la Chl-*a* en tratamientos que evaluaron la interacción resultó semejante a lo observado para el efecto *L. fortunei*. No obstante, se registró una acción aparentemente sinérgica sobre la Chl-*a* para la dosis más baja de glifosato (**1+Lf**) a tiempo final aumentando en promedio 7 veces respecto al tiempo inicial. Este

comportamiento puede ser debido a que en las unidades experimentales conteniendo ambos factores se ha desarrollado profusamente las algas filamentosas del tipo zygnematales del metafiton (Fig. 64) que, al desprenderse en forma azarosa del sustrato, produjeron un comportamiento mas irregular de la concentración de Chl-*a* en la columna de agua que el observado solo en presencia del mejillón.

En cuanto a las comunidades microbianas, hemos observado un efecto sinérgico del glifosato y del mejillón *L. fortunei* sobre la abundancia del bacterioplancton, como también un aumento más pronunciado en la clorofila-*a* del perifiton. Asimismo, el desarrollo del metafiton observado en presencia de mejillón fue más acentuado en los tratamientos que evaluaron la interacción. A tiempo inicial la abundancia bacteriana fue muy diferente entre réplicas, por lo que se optó por relativizar los datos al día 0 de cada microcosmos para analizar y visualizar los cambios a partir del tiempo cero, en cada unidad experimental. El mismo criterio fue tomado por Pérez *et al.* (2007) debido a la gran variabilidad encontrada en casi todas las variables, al trabajar en mesocosmos al aire libre. En nuestro caso, es de destacar que si bien durante las semanas previas al experimento se homogeneizó activamente el agua de los tres tanques mediante el uso de bombas y mangueras, se generaron sistemas similares pero no idénticos, lo que es esperable cuando se realizan experimentos a mayor escala en meso y microcosmos al aire libre. El aumento registrado en el número de bacterias totales en la columna de agua a lo largo del experimento en todos los tratamientos pudo deberse a un efecto de confinamiento en microcosmos (75 litros) ya que cuerpos de agua de menor tamaño facilitan la disponibilidad de los nutrientes para las comunidades microbianas del sistema (Pesce *et al.* 2009). Asimismo, la aireación continua pudo haber estimulado la mezcla de la columna de agua, recirculando los nutrientes haciéndolos más accesibles para las comunidades planctónicas. A diferencia de lo observado por otros autores, en donde registraron el aumento en la abundancia bacteriana a partir del agregado de glifosato (Amorós *et al.* 2007, Pérez *et al.* 2007), en nuestro experimento no observamos el mismo efecto sobre esta comunidad. Vera (*et al.* 2012) en experimento semejante en microcosmos (90 litros) a la intemperie en los que evaluaron el efecto del formulado Glifosato Atanor®, a dosis de 3,5 mg l⁻¹ i.a., registraron a tiempo final (día 21) una abundancia del bacterioplancton de 4,2 x 10⁶ y

$5,96 \times 10^6$ bacterias ml^{-1} , en tratamientos sin y con herbicida respectivamente, siendo estadísticamente mayor en microcosmos con glifosato. En nuestro experimento, en cambio, a partir del día 7 se cuantificó una abundancia bacteriana total entre 6×10^6 y 8×10^6 bacterias ml^{-1} , en los tratamientos que evaluaron el efecto glifosato. A pesar de ser mayores los valores que aquellos registrados por Vera *et al.* (*op. cit*) nosotros no encontramos diferencias entre el tratamiento sin herbicida y aquellos con 1, 3 y 6 mg l^{-1} de glifosato.

Limnoperna fortunei, por su parte, tampoco generó efecto diferencial sobre la abundancia bacteriana, a pesar de ejercer una presión de predación sobre dicha comunidad (Karatayev *et al.* 2007). Se observó, no obstante, un efecto sinérgico del glifosato y el mejillón sobre el bacterioplancton, particularmente a dosis baja y media (**1+Lf** y **3+Lf**), alcanzando valores máximos a tiempo final de más de dos veces que aquellos registrados solo con *L. fortunei*. De acuerdo a nuestros resultados, el glifosato no estaría estimulando el desarrollo del bacterioplancton, por lo que sería necesaria la degradación de la molécula por parte del mejillón para que las bacterias de la columna de agua pudieran utilizar el fosfato y aumentar en abundancia. Podríamos suponer entonces que, en cuerpos de aguas naturales de pequeño tamaño (i.e. charcos, cuerpos temporarios), la acción conjunta del mejillón dorado y el glifosato facilitaría el crecimiento del bacterioplancton, acelerando el deterioro del sistema. Así como Vera *et al.* (2012) describieron que una sola aplicación de glifosato estimuló la eutroficación del sistema, **nosotros comprobamos que en un ambiente en el que se encuentre el molusco *Limnoperna fortunei*, una sola aplicación de glifosato -en distintas concentraciones- no sólo estimula, sino que acelera el desarrollo del bacterioplancton, propiciando el deterioro más rápido de la calidad del agua del sistema.**

A diferencia de lo observado con el bacterioplancton, la abundancia del fitoplancton fue gradualmente disminuyendo en el tratamiento control (**0-Lf**), debido posiblemente al efecto de confinamiento. Como fuera observado por Vera *et al.* (2012) y discutido por Pesce *et al.* (2009) los cuerpos de agua de menor tamaño, como son los microcosmos aquí utilizados (70 l), aceleran los procesos funcionales del sistema debido al confinamiento de los recursos, llevando a un rápido empobrecimiento en la calidad del agua. Esto estaría provocando la disminución de la abundancia total del

fitoplancton en todos los tratamientos. La presencia de *Limnoperna fortunei* generó en la primeras 24 hs un súbito y marcado descenso en la abundancia fitoplanctónica (90-93% de la abundancia a tiempo inicial), que se vio reflejada en una rápida disminución en la turbidez del agua. En trabajos previos se ha observado una significativa reducción del fitoplancton por parte del molusco durante las primeras 24-48 hs experimentales, con disminuciones respecto a la abundancia a tiempo inicial del 99% (Cataldo *et al.* 2012b) y del 52 y 86% (Frau *et al.* 2012). El aumento en la transparencia del agua generada por la actividad filtradora de los mejillones fue detectable a simple vista al día 1 (Figs. 45 y 46), como ya ha sido informado por diversos autores (Boltovskoy *et al.* 2009a, Karatayev *et al.* 2007). Una rápida disminución en el fitoplancton y aumento en la transparencia también ha sido observado en experimentos en mesocosmos con el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* (Heath *et al.* 1995, Wilson *et al.* 2003).

En la Chl-*a* también se pudo registrar el potente efecto filtrador de *Limnoperna fortunei* ya mencionado más arriba. En 24 hs hubo una drástica disminución de la concentración de dicho pigmento, producto del intenso consumo algal por parte del molusco. A partir de la primer semana la Chl-*a* aumentó en presencia de *L. fortunei*, aunque la abundancia del fitoplancton no siguió la misma tendencia, manteniéndose baja y menor al tratamiento sin mejillón (**0-Lf**) durante todo el período experimental. Tal como fuera detallado más arriba, las algas filamentosas del metafiton que se desarrollaron en presencia de mejillón, pudieron haber afectado el desarrollo del fitoplancton de mayor tamaño ya que formaron grandes matas suspendidas en la superficie de los microcosmos –una vez desprendidas del sustrato donde inicialmente se desarrollaron (i.e. perifitómetros, jaulas de moluscos)- generando una competencia con el fitoplancton, y aportando Chl-*a* a la columna de agua. Si bien, se intentó descartar los mechones de metafiton al momento de tomar las muestras de agua para análisis fitoplanctónico, es probable que haya habido “contaminación” por parte de filamentos del metafiton en suspensión, que habrían generado una sobreestimación de los valores de clorofila-*a* fitoplanctónica. No obstante, dicha “contaminación” no fue registrada en el análisis cuantitativo, no evidenciándose un significativo aporte de algas filamentosas del tipo zygnematal en la composición del fitoplancton ya que al llenar las cámaras de sedimentación para los recuentos algales bajo microscopio se buscó

apartar las matas macroscópicas para reducir el error por interferencia del metafiton. Si bien en un estudio semejante en mesocosmos a la intemperie Pérez *et al.* (2007) registraron un aumento de la Chl-*a* en tratamientos con Roundup (3 y 6 mg l⁻¹ de i.a.) sin observar cambios en la abundancia fitoplanctónica, encontraron que dicho aumento en la concentración del pigmento estaba explicado por un importante desarrollo de la abundancia de las picocianobacterias. En nuestro trabajo, la ausencia del picoplancton (algas de tamaño entre 0,2-2 µm) en todos los tratamientos resulta llamativo. La composición y abundancia de la comunidad de picoplancton puede depender fuertemente de la tipología y morfogénesis de un ambiente lótico, y varía de manera sustancial en cuerpos de agua someros (Callieri 2007). Si bien dicha autora indica que en ambientes someros eutróficos se puede encontrar una conspicua comunidad picoplanctónica, también sugiere que el picoplancton es sensible a las intensas radiaciones solares y a la luz UV. Podríamos suponer que al momento de llevar a cabo el experimento, la alta irradiancia lumínica características de dicho período estival pudo haber afectado la viabilidad del picofitoplancton. Asimismo, el picoplancton pudo también haberse visto sometido a una fuerte presión de predación, no solo en los tratamientos con mejillón, sino también por la presencia de flagelados heterotróficos, pequeños ciliados y larvas nauplii de copépodos, que constituyen los principales consumidores del picoplancton (Callieri 2007). No hay que descartar el efecto del metafiton sobre esta comunidad. Las algas filamentosas del grupo de las zygnematales presentan una pared celular generalmente delgada, formada de dos capas de las cuales la externa péctica transformada en mucílago les da un tacto mucoso característico (Bourrelly 1990). La enorme cantidad de mucílago generado por las masas de estas algas pudo tener algún efecto alelopático que evitara la proliferación de esta fracción planctónica (e.g. las algas de *Zygnema* sp., *Mougeotia* sp., *Spirogyra* sp., estos géneros no presentan organismos adheridos, según Pizarro (com. pers.)).

En cuanto a la mezcla del metafiton con la comunidad del fitoplancton, esto es típico de los sistemas poco profundos. Según Goldsborough y Robinson (1996), en cuerpos de agua someros (e.g. pantanos, humedales) los compartimentos ecológicos (i.e. plancton, metafiton, perifiton) no sólo tienen más interacción debido a la poca profundidad, sino que al haber una mayor capacidad de mezcla de toda la columna, puede resultar difícil separar las distintas comunidades algales debido al

desprendimiento y suspensión de las formas adheridas. Por otro lado, el metafiton no solo compite con las algas fitoplanctónicas por luz y nutrientes, puesto que al flotar las matas reducen la luz que penetra en la columna de agua, sino que también funciona como refugio de organismos zooplanctónicos que predan sobre el fitoplancton (Goldsborough y Robinson 1996), generando posiblemente una disminución en la abundancia y la Chl-*a* fitoplanctónica.

Las algas que poseen estrategias para evitar la predación por parte de *L. fortunei* como puede ser adquirir un mayor tamaño (i.e. algas filamentosas, coloniales) o poseer algún mecanismo de defensa (i.e. espinas, toxinas, baja palatabilidad), se van a ver favorecidas en presencia de los mejillones puesto que estos van a consumir preferentemente algas más palatables del fitoplancton, como así también parte del zooplancton, disminuyendo la competencia y la presión de predación sobre dichos organismos (Strayer 2010). En experimento corto (72 h) en microcosmos (200 l), Frau *et al.* (2012) encontraron una mayor presión de predación de *L. fortunei* sobre algas solitarias y diatomeas, favoreciendo los grupos de algas flageladas que tienen mayor motilidad y posibilidad de evitar el predador (e.g. *Chlamydomonas* spp.). Asimismo, el desarrollo de grandes matas de metafiton registrado por nosotros en tratamientos con mejillón proveen de un refugio para los organismos zooplanctónicos, permitiendo la existencia de grupos de mayor tamaño (i.e. cladóceros), como fue observado a tiempo final en dichos tratamientos, ejerciendo posiblemente una mayor presión de predación sobre el fitoplancton palatable.

Por su parte, si bien el glifosato no generó diferencias en la abundancia fitoplanctónica, la disminución gradual registrada a lo largo del experimento en todos los tratamientos fue más lenta en microcosmos con herbicida, indicando que el glifosato a pesar de no haber generado un claro aumento del fitoplancton, estaría estimulándolo en comparación con el control (sin herbicida). Estudios previos (Pesce *et al.* 2008) sugieren que la carga de glifosato en un río favorecería el desarrollo de especies de algas fitoplanctónicas de menor tamaño que reemplazarían en dominancia a las algas de mayor tamaño. Como ha sido comentado en la Introducción de esta sección, en experimentos en meso y microcosmos a la intemperie, se ha registrado un aumento en el número de picocianobacterias (Pérez *et al.* 2007) y cianobacterias fitoplanctónicas (Vera *et al.* 2010 y 2012) frente al agregado de formulados a base de

glifosato (Roundup® y Glifosato Atanor®). Además de que las concentraciones de glifosato utilizadas en dichos experimentos (3,5-12 mg l⁻¹) fueron diferentes a las que usamos en esta tesis (1-6 mg l⁻¹), el origen de las comunidades algales, el volumen de los cuerpos de agua artificiales y el tipo de herbicida utilizado (formulado vs. glifosato) también variaron entre experimentos. Como suele pasar en estudios a nivel ecosistémico, posiblemente esta problemática sea explicada entonces por la combinación de múltiples variables de cada sistema y cada experimento en cuestión. En cuanto a la interacción entre los agentes evaluados, no se observó un efecto conjunto sobre la abundancia fitoplanctónica. En este caso, *L. fortunei* es el único agente de cambio sobre la comunidad, que la mantuvo en valores de abundancia bajos, siempre menores a 5000 indiv ml⁻¹. El molusco pone en evidencia aquí también su papel de "ingeniero biológico", tan importante para la estructura y funcionalidad de todo el ecosistema (Sylvester *et al.* 2007).

Independientemente del tratamiento, el fitoplancton se encontró en promedio siempre dominado por las algas del grupo de las clorofitas no-filamentosas que varió en un rango entre 47 y 93% de la abundancia total. En términos generales, la primera minoría estuvo caracterizada por el nanofitoplancton menor a 5 µm, seguido por las crisofitas. La presencia de *Limnoperna fortunei* generó una disminución significativa en el grupo de las clorofitas no-filamentosas durante las primeras 24 hs. Si bien el rango de tamaño que puede consumir el adulto de *Limnoperna fortunei* es muy amplio, comprendido entre 4 µm y 1 mm (Rojas Molina *et al.* 2010), el consumo de algas por parte del mejillón es selectivo, prefiriendo partículas pequeñas (menor a 100 µm) y rechazando algas coloniales o cianobacterias tóxicas (Boltovskoy *et al.* 2009b, Cataldo *et al.* 2012b, Heath *et al.* 1995, Juhel *et al.* 2006, Rojas Molina *et al.* 2010, Sylvester *et al.* 2005). Análisis del contenido estomacal de adultos de *L. fortunei* en la cuenca del Paraná (Provincia de Santa Fé), indicó que las algas resultaron preponderantes en abundancia y entre ellas los grupos más frecuentes fueron las euglenofitas (en 99% de los contenidos estomacales), seguido por las diatomeas y las clorococales (en 96% de los organismos estudiados). Las criptofitas en cambio no se encontraron en el contenido estomacal de los mejillones aunque fue el grupo dominante en el ambiente en el estudio realizado por Rojas Molina *et al.* (2010). Dichos autores sugieren que la ausencia de criptofitas en los estómagos puede deberse a que son algas pequeñas con

rápida digestión y que por lo tanto la selectividad negativa hacia este grupo sea solo aparente. Asimismo, Heath *et al.* (1995) registraron un selectivo consumo de diatomeas por parte del mejillón cebra *Dreissena polymorpha* en ensayos en mesocosmos. De acuerdo con nuestros resultados el mejillón estaría alimentándose preferentemente de las clorofitas no-filamentosas, no solo porque se trató de células pequeñas, siendo caracterizadas principalmente por el grupo de *Staurastrum* spp, sino también por ser estas las más abundantes a tiempo inicial, representando en promedio un 88% de la abundancia total del fitoplancton. Luego del primer impacto del mejillón sobre las clorofitas no-filamentosas, estas volvieron a aumentar en número, sugiriendo que la alta tasa filtradora de *L. fortunei* si bien provocó su disminución por alto consumo, también favorece su crecimiento y desarrollo, puesto que aporta nutrientes y transparencia al agua, como fuera observado por Frau *et al.* (2012) para las algas flageladas. Evidentemente luego de las primeras 24 hs, la tasa reproductiva de las algas verdes resultó mayor que la tasa de consumo por parte del mejillón. Asimismo, en presencia de mejillón, los grupos minoritarios se diversificaron, viéndose favorecidas las clorofitas filamentosas que alcanzaron a tiempo final una abundancia relativa del 7%. La relación de los nutrientes en la composición algal no está del todo estudiada, sin embargo Borchardt (1996) sugiere que existen otros factores que determinan la composición de especies frente a cambios en la concentración de los nutrientes disponibles. No obstante, de manera general indican que las clorofitas filamentosas se vuelven abundantes cuando hay suficiente luz y cuando la relación N:P es alta (como fue observado en presencia del mejillón al día 14) como por ejemplo en ambientes eutróficos. Asimismo, parte de las clorofitas filamentosas observadas en presencia de *L. fortunei* correspondieron al tipo zygnematales, características de algas del metafiton, sugiriendo entonces que el aumento en la Chl-*a* en el tratamiento con mejillón se debió entonces principalmente a la presencia de algas de metafiton. Cataldo *et al.* (2012b) en ensayos de 24 hs en mesocosmos encontraron una rápida disminución del fitoplancton en presencia de *L. fortunei*, sin generar un patrón diferencial en las abundancias relativas de las algas del fitoplancton, no encontrando una relación entre la presión de consumo sobre las distintas taxa algales y el tamaño de las células. En dicho ensayo los recuentos algales arrojaron valores muy bajos y el tiempo experimental muy corto por lo que se podrían estar obviando otros efectos inmediatos sobre el fitoplancton (e.g.

interacciones con otras comunidades), como también cambios en el mediano y largo plazo que no habrían sido detectados por el diseño experimental. Asimismo, dichos autores discuten sobre la complejidad de obtener conclusiones contundentes sobre la selectividad de *L. fortunei* en el consumo de algas puesto que estudios sobre el mejillón *Dreissena polymorpha* derivan en resultados contrapuestos, determinando que la selectividad de los mejillones en su alimentación varía con las condiciones ambientales, la calidad y disponibilidad del alimento, y el estado metabólico de los organismos filtradores.

En cuanto al efecto del herbicida sobre las abundancias relativas del fitoplancton, no se registró un efecto significativo. Si bien hubiéramos esperado que las algas que poseen la ruta del ácido shikímico se vieran perjudicadas frente al agregado de glifosato, la disminución en la abundancia relativa de las clorofitas no-filamentosas en los tratamientos **1-Lf** y **3-Lf** no resultó significativa, siendo este grupo dominantes durante todo el período experimental. Asimismo, el principal grupo minoritario fue el nanofitoplancton menor a 5 μm , que presentó una tendencia (no significativa) a aumentar frente a dosis baja y media de glifosato. Vera *et al.* (2012) en experimento semejante en microcosmos (90 l) también registraron un aumento en el micro y nanoplancton a la semana en tratamientos con 3,5 mg l⁻¹ (i.a.) de Glifosato Atanor®. Sin embargo encontraron que a tiempo final (día 21), la abundancia en esta fracción algal volvió a disminuir, explicado como la consecuencia de una mayor presión de predación por parte de cladóceros que se que vieron estimulados en tratamiento con herbicida. Si bien no se registró un particular desarrollo en las cianobacterias, las que registran algunas especies capaces de usar el glifosato como una fuente de energía sin ser afectadas por su acción herbicida (Forlani *et al.* 2008, Ravi y Balakumar 1998), para la dosis media de glifosato (**3-Lf**) se observó un aumento de las cianobacterias filamentosas (*Nostoc* spp.) con una abundancia relativa del 7% al tiempo final.

En el tratamiento sin glifosato y sin la presencia del molusco, *Staurastrum* sp1 dominó el fitoplancton durante la primera semana experimental, disminuyendo hacia tiempo final, a la vez que aumentó la abundancia relativa de *Monoraphidium griffithii* y *Oocystis* spp. La presencia de *Limnoperna fortunei* (**0+Lf**) favoreció el desarrollo de las especies flageladas que pueden evitar la predación, como *Chlamydomonas* spp. (con un 46% de la abundancia total al día 7). Frau *et al.* (2012) observó un aumento de la

abundancia relativa de los grupos flagelados (dominado por *Chlamydomonas* spp. y criptomonas) en presencia de *L. fortunei*. Dichos autores discuten que si bien tienen alta palatabilidad, estas algas poseen elevada tasa reproductiva, por lo que pudieron ser más eficientes en aprovechar la remineralización de nutrientes generada por la presencia del mejillón. Wilson (2003) en experimento en mesocosmos evaluando el impacto del mejillón cebra *Dreissena polymorpha* sobre el fitoplancton encontró que en tratamientos con bivalvos disminuyó significativamente la abundancia de las algas verdes de menor tamaño y de las criptofitas, sin verse una reducción en la abundancia de las algas coloniales. Asimismo, de acuerdo a nuestros resultados, se observó que *L. fortunei* favoreció especies cenobiales como *Kirchneriella* spp (con un 43% al día 14) y *Scenedesmus* spp (19% a tiempo final) y desmidiáceas como *Staurastrum* (29% a tiempo final), posiblemente porque poseen preferencia por algas de menor tamaño, como fuera discutido anteriormente. En esta variable, no se observó un claro efecto del glifosato ni de la interacción entre glifosato y *L. fortunei*, siendo su variación determinada principalmente por la presión del mejillón.

Así como se observó una clara disminución en la abundancia fitoplanctónica durante las primeras 24 h en presencia de *Limnoperna fortunei*, también el mejillón generó una significativa disminución en el porcentaje de algas muertas en la columna de agua. El mejillón filtra y retiene las partículas de un tamaño determinado, preferentemente aquellas menores a 100 μm (Cataldo *et al.* 2012b, Frau *et al.* 2012, Sylvester *et al.* 2005), siendo expulsado como pseudoheces todo aquello que no es ingerido por el organismo. Todo el material -orgánico e inorgánico- empaquetado y expulsado como pseudoheces, puede luego sedimentar con mayor facilidad al fondo y por lo tanto escapar de la columna de agua. Por otro lado, el microfilm orgánico adherido al frústulo de las diatomeas podría resultar palatable para los mejillones y podría estar siendo efectivamente ingerido, como sucede en otros bivalvos (Beninger y Decottignies 2005), eliminando los frústulos a la columna de agua. En el tratamiento control (**0-Lf**), si bien la abundancia fitoplanctónica fue gradualmente disminuyendo a lo largo del experimento, el porcentaje de algas muertas se mantuvo estable entre 18-20% por ml durante las primeras dos semanas indicando que el confinamiento afectó negativamente la supervivencia de esta comunidad. Por su parte, en presencia de mejillón, a pesar de no variar demasiado el fitoplancton en su abundancia después del

día 1, el porcentaje de algas muertas continuó disminuyendo, indicando que el crecimiento algal de esta comunidad se vio favorecido en presencia del mejillón pasadas las primeras 24 h experimentales. *Limnoperna fortunei* estaría entonces generando un efecto "rejuvenecedor" de la comunidad fitoplanctónica ya que estaría atrapando las algas muertas derivándolas a pseudoheces, mientras que generaría mayor disponibilidad de nutrientes para el desarrollo de nuevos individuos.

El glifosato no generó un patrón significativamente distinto al observado en el tratamiento control sobre el porcentaje de algas muertas en la columna de agua, aunque la gran variabilidad entre réplicas dificultó el análisis estadístico entre tratamientos. Sin embargo, Vera *et al.* (2012) en microcosmos semejantes a los aquí utilizados encontró un aumento significativo en el número de algas muertas (clorofitas y diatomeas) en tratamientos con 3,5 mg l⁻¹ de glifosato (formulado Roundup®). Puede ser que el formulado Roundup® genere una mayor mortandad en el fitoplancton debido a la toxicidad del coadyuvante que muchas veces supera aquella del herbicida (Clair *et al.* 2012, Contardo-Jara 2009a, Folmar *et al.* 1979, Tsui y Chu 2003). La interacción de ambos agentes, no afectó diferencialmente la composición estructural del fitoplancton, siendo entonces en nuestro experimento, la presencia del molusco la fuerza modeladora de la estructura fitoplanctónica.

El perifiton resultó una variable en la que se puede observar un efecto indirecto de la interacción de los agentes. En particular, se observa que el gran desarrollo del metafiton fue el determinante para que la comunidad perifítica, desarrollada en sustratos artificiales, se viera afectada competitivamente por nutrientes y por la luz, debido al efecto de sombreado. En el perifiton y en coincidencia con nuestros resultados, Cataldo *et al.* (2012a) observaron que luego de 5 semanas el perifiton desarrolló significativamente más Chl-*a* en tratamientos con *L. fortunei*, a la vez que se registró una disminución en el IA hacia valores menores a 100, indicando una comunidad predominantemente autótrofa, en mesocosmos ubicados dentro de un embalse. Esta transformación hacia la autotrofia, pudo ser el resultado del aumento en la transparencia del agua y el aporte de nutrientes dado por la actividad filtradora de los mejillones, lo que favorecería el desarrollo de las algas del perifiton, como fue sugerido previamente por otros autores (Boltovskoy *et al.* 2009a, Lowe y Pillsbury

1995). Además, la gran cantidad de algas filamentosas del metafiton muy desarrollado en los microcosmos con ambos agentes, comenzaron a crecer en el perifiton para luego desprenderse y formar matas flotantes. Estas algas seguramente se encontraban entre adheridas y entremezcladas a los sustratos de perifiton, alterando significativamente la colonización de la comunidad adherida. El glifosato, por su parte, si bien no generó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, favoreció el desarrollo de las algas del perifiton, estimulando el aumento de la Chl-*a*, especialmente a menores dosis de herbicida (**1-Lf**) lo que se vio reflejado en la importante disminución del IA en tratamientos con glifosato. Austin *et al.* (1991) en arroyos oligotróficos encontraron que el agregado de glifosato (hasta 0,3 mg l⁻¹ de formulado Vision®) estimuló el aumento de la fracción orgánica (PSLC) del perifiton. Sin embargo, Pérez *et al.* (2007), observaron que en mesocosmos con herbicida Roundup® (6 y 12 mg l⁻¹ de glifosato) disminuyó la abundancia total del perifiton a la vez que aumentó el IA respecto al tratamiento control, indicando que el formulado modificó la estructura de la comunidad adherida, llevándola a condiciones más heterotróficas (bacterias, hongos, detrito orgánico y protistas heterótrofos). En Vera *et al.* (2010) se observó un retraso en la colonización de los sustratos por parte del perifiton en aquellos mesocosmos con agregado de herbicida Roundup® (8 mg l⁻¹ glifosato) siendo todas las variables de masa (PS, PSLC y Chl-*a*) siempre mayores en el tratamientos control, sin glifosato. Por su parte Goldsborough y Brown (1988) observaron que la actividad fotosintética del perifiton disminuyó frente a mayores dosis de herbicida Roundup® (dosis menores a 0,09 mg l⁻¹ de glifosato), sugiriendo que dicho efecto es dependiente de las características físico-químicas del agua, como así también de las propiedades de la comunidad perifítica. Posiblemente los resultados contrapuestos en la bibliografía se deban a la gran variedad de características que condicionan las respuestas a nivel ecosistémico (i.e. uso de glifosato puro y tipos de formulado, características morfométricas del sistema, diseño experimental). En el experimento en microcosmos (90 l) a la intemperie realizado por Vera *et al.* (2012) con una comunidad de perifiton ya establecida a tiempo inicial, los resultados fueron semejantes a los presentados en esta Sección. Vera *et al.* (*op cit.*) registraron un aumento significativo en las variables de masa (PS, PSLC y Chl-*a*) en los tratamientos con Glifosato Atanor® (3 mg l⁻¹ i.a.), a la vez que el IA fue 3 veces menor en microcosmos con glifosato respecto del tratamiento sin

herbicida. También observaron luego de la primera semana experimental el desarrollo sobre los perifitómetros de matas de metafiton que estuvieron presentes hasta el final del experimento (21 días), compuestas por clorofitas filamentosas del tipo *Oedogonium* spp. y *Mougeotia* sp. Dichos autores discuten que este desarrollo estaría reflejando un fenómeno de enriquecimiento orgánico en todo el sistema deteriorando la calidad del agua en su conjunto. Así como en nuestro caso, el incremento en la Chl-*a* y la disminución en el IA observada en el perifiton estaría siendo explicada por las algas del metafiton adheridas a los sustratos. El glifosato, tanto en el experimento de Vera *et al.* (2012) como en nuestro estudio, estimuló el crecimiento algal del perifiton (disminuyendo el IA) y generando el desarrollo de algas de metafiton.

En los tratamientos con ambos agentes, el aumento de las variables de masa y de la Chl-*a* fue más rápido y más pronunciado, indicando que su interacción favoreció el desarrollo de la fracción orgánica del perifiton. Si bien no hubo un efecto conjunto sobre el IA, predominó el efecto de *Limnoperla fortunei*, viéndose a partir del día 7 una importante disminución en el IA alcanzando valores de IA entre 188 y 253, indicando características predominantemente autótrofas en las comunidades perifíticas. Como fue descrito para el efecto *L. fortunei*, con ambos agente se registró también el desarrollo de una comunidad conspicua de algas filamentosas macroscópicas de metafiton, que nuevamente alteraron los valores de autotrofia del sistema. Es posible que al suministrar glifosato en presencia de mejillón, el aporte de nutrientes que se vuelven disponibles debido a la interacción con el mejillón, provoque una contaminación orgánica del sistema que se evidencia en un deterioro general con el desarrollo de matas de metafiton, características de sistemas someros, aguas quietas y alta concentración de nutrientes (Goldsborough y Robinson 1996).

El gran desarrollo metafítico especialmente visible a tiempo final, afectó a las variables de masa del perifiton en la última fecha en presencia de *Limnoperla fortunei*, por competir por nutrientes y luz, dado por el efecto sombreado sobre la comunidad microscópica adherida. Además, la extrema cercanía entre comunidades se traduce en un *continuum* de organismos entre ambas lo que genera interferencias en los análisis por separado de cada comunidad. Según Goldsborough (*et al.* 2005) el metafiton puede aportar hasta 400 veces más clorofila-*a* que las algas perifíticas, lo que implica que la presencia de algunos ejemplares metafíticos en el perifiton puede modificar

significativamente los valores del pigmento. Adicionalmente en el perifiton, en presencia del mejillón se registró un aumento en la abundancia relativa de las cianobacterias filamentosas del género *Nostoc* spp. que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, indicando aguas limitadas por nitrógeno, posiblemente debido a su gran utilización por parte del metafiton.

El glifosato por sí solo no generó diferencias significativas en la abundancia de las algas del perifiton ni sobre la abundancia relativa de sus principales grupos, como tampoco se registraron modificaciones significativas sobre los hábitos de vida (filamentosas vs. cocoides). Vera *et al.* (2012), registraron el mismo orden de dominancia de los principales grupos algales (clorofitas, seguido por cianobacterias y diatomeas) pero, a diferencia de nuestro experimento, observaron un aumento de los tres grupos con el agregado de Glifosato Atanor®. Por otro lado, Gustavson *et al.* (2003) realizaron un estudio para evaluar el impacto de herbicidas sobre el perifiton y observaron que los distintos grupos algales responden diferencialmente viéndose las clorofitas severamente afectadas, mientras que las cianobacterias y las diatomeas pudieron recuperarse luego de la exposición al fitotóxico. En nuestro caso, el aumento en las cianobacterias y diatomeas se dio por efecto del mejillón aisladamente, lo que pone en evidencia la complejidad de respuestas que presentan las comunidades a una escala ecosistémica, al impacto de diferentes agentes de cambio.

Se sabe que diversos grupos de cianobacterias son capaces de utilizar al glifosato como fuente de energía entre ellas: *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc punctiforme* (Forlani *et al.* 2008), *Anabaena variabilis* (Ravi y Balakumar 1998) y *Spirulina* spp. (Lipok *et al.* 2007), sin ser afectadas por el efecto biocida puesto que poseen una vía alternativa por ser organismos procariotas (Powell *et al.* 1991). Otros autores han registrado en experimentos en meso y microcosmos el aumento en la abundancia relativa de cianobacterias del perifiton en presencia de formulados a base de glifosato (Pérez *et al.* 2007, Vera *et al.* 2010 y 2012), sin embargo nosotros observamos este desarrollo particularmente en tratamientos con presencia de mejillón (tanto sin y con glifosato). Las cianobacterias nuevamente aparecen como organismos hábiles de desarrollarse en condiciones extremas, como en este caso significa el deterioro de la calidad del agua. Por otro lado, observamos el aumento de las diatomeas a tiempo final en los tratamientos con ambos agentes. En el perifiton, Vera *et al.* (2010 y 2012)

encontraron que las diatomeas se vieron afectadas y sufrieron una disminución en su abundancia en escenarios con formulados de glifosato. En nuestro caso, resultaron favorecidas probablemente por las condiciones generadas por la interacción de ambos agentes (i.e. aporte de nutrientes, mayor transparencia del agua) ya que, a pesar de ser las diatomeas algas palatables para *L. fortunei*, al estar inmersas en una comunidad adherida a un sustrato, no fueron accesibles para su consumo por parte de mejillones sésiles (Heath *et al.* 1995). A diferencia de lo que sucede con el fitoplancton, el perifiton se encuentra inmerso en una matriz de polisacáridos que puede limitar la interacción del agente contaminante con los organismos en ella.

El porcentaje de algas muertas del perifiton se vio reducido en todos los tratamientos a tiempo final, con la tendencia a ser mayor en presencia de ambos agentes (glifosato y *L. fortunei*). En trabajos previos, en cambio, se registró un aumento en el porcentaje de algas muertas en el perifiton tratado con Roundup® a concentraciones de 6 y 12 mg l⁻¹ (Pérez *et al.* 2007). Como sucedió con el fitoplancton, la acción filtradora del mejillón y el aporte de fosfato por parte del glifosato pudo estimular el crecimiento de las algas perifíticas, en especial los grupos filamentosos de cianobacterias.

En cuanto a la comunidad de zooplancton, si bien hubo un decrecimiento de la abundancia total, se encontraron interesantes diferencias según los escenarios. A tiempo inicial, si bien el grupo de los copépodos fue dominante en todos los tratamientos, a tiempo inicial el 93% de ellos (72% del zooplancton) estuvo representado por larvas nauplii, lo que indicaría que al comenzar el experimento los copépodos estaban en plena etapa reproductiva. No obstante, es importante tener en cuenta que a tiempo inicial las muestras fueron tomadas de los tanques lo que pudo generar la evasión de los adultos hacia zonas más profundas, por la migración vertical (Lampert y Sommer 1997), y a su mayor capacidad en evadir predadores debido a su habilidad natatoria más desarrollada. A tiempo final, en cambio, se filtró todo el volumen de cada microcosmos y se volvió a encontrar una alta abundancia relativa de larvas nauplii, representando más del 70% del total de copépodos en todos los tratamientos. Durante el experimento, la disminución en la abundancia total del zooplancton entre el tiempo inicial y el final podría ser el resultado de diversas

cuestiones. Podríamos suponer que dicha variación responde a un efecto del confinamiento de los recursos, con mayor competencia por estos, a la vez que podría haberse generado una mayor presión de predación sobre el zooplancton por parte de *Limnoperna fortunei*, al reducirse el volumen de los cuerpos de agua entre los tiempos analizados. Además, también se podría hipotetizar un efecto directo de toxicidad del herbicida, como fuera observado en trabajos previos. Chen *et al.* (2004) registraron en bioensayos una disminución en la supervivencia y el desarrollo de una especie de cladóceros expuesto a una concentración de 1,5 mg l⁻¹ de glifosato (formulado Vision®), aunque estos resultados son muy difíciles de extrapolar a los nuestros, debido a las enormes diferencias entre los diseños experimentales. Vera *et al.* (2012) en microcosmos con agregado de Glifosato Atanor® (a 3,5 mg l⁻¹ glifosato), registraron una disminución en la abundancia de los copépodos adultos, lo que fue atribuido a un efecto directo de toxicidad sobre sus larvas y por lo tanto una disminución en la abundancia de los siguientes estadios.

Si bien, el zooplancton total disminuyó de tiempo inicial al final, en presencia de *Limnoperna fortunei*, a tiempo final su abundancia fue dos veces superior que aquella en tratamientos sin mejillón, aún cuando hubiéramos esperado que el zooplancton se viera afectado por una mayor presión de predación por parte del molusco (Rojas Molina *et al.* 2010). A diferencia de nuestros resultados, en ambientes lóticos naturales invadidos por *L. fortunei* se ha registrado una importante disminución en el zooplancton, particularmente en los rotíferos (Rojas Molina y José de Paggi 2008). En un estudio del contenido estomacal de *L. fortunei* (Rojas Molina *et al.* 2010) se encontró que los rotíferos son el grupo más consumido por el mejillón, posiblemente debido a su menor tamaño y su poca capacidad natatoria, seguido por cladóceros. Los copépodos ocuparon el último lugar, siempre representados por larvas nauplii. Los copépodos adultos tendrían la capacidad de detectar señales hidrodinámicas en el agua debido a la presencia de un predador, y por lo tanto activarían un mecanismo de fuga (Fields y Yen 1997), lo que podría explicar la dominancia de copépodos en el ambiente, y su alta tasa reproductiva generando alta abundancia de larvas nauplii. Asimismo, en presencia de *L. fortunei* habría mayor disponibilidad de alimento puesto que el mejillón estimuló el desarrollo de algas del perifiton y del metafiton, ofreciendo alimento y refugio a los organismos del zooplancton.

En cuanto al glifosato, se observó a tiempo final una tendencia a mayor abundancia del zooplancton a mayores concentraciones de herbicida. Una posible explicación es que habría más disponibilidad de alimento en los tratamientos con herbicida, ya que la disminución en el fitoplancton fue más lenta en tratamientos con glifosato. Por otro lado, también el perifiton más desarrollado pudo ser fuente de alimento para los zoopláncteres. A pesar del efecto nocivo que tienen los formulados a base de glifosato sobre organismos del zooplancton registrado por otros autores (Chen *et al.* 2004, Vera *et al.* 2012) nosotros hemos detectado un efecto opuesto, viéndose estimulado el desarrollo del zooplancton, especialmente los copépodos, a mayores dosis de glifosato. Es posible que los efectos adversos registrados previamente se deban por un lado una mayor toxicidad del formulado -que contiene sustancias aditivas y coadyuvantes- (Clair *et al.* 2012, Contardo-Jara 2009a, Folmar *et al.* 1979, Tsui y Chu 2003), como también a las diferentes respuestas de las demás comunidades en los distintos experimentos.

En los tratamientos que evaluaron la interacción del glifosato y *L. fortunei* sobre las abundancias relativas del zooplancton se observó que si bien estuvo determinado por el efecto del mejillón, siendo dominantes los copépodos, a tiempo final se registró un aumento de los cladóceros en relación a una disminución de copépodos a mayores dosis de glifosato, habiendo en promedio 2,6 veces más cladóceros en presencia del mejillón respecto a los tratamientos sin *L. fortunei*. Los cladóceros constituyen los componentes de mayor tamaño del zooplancton, y el aumento en su abundancia relativa posiblemente se encuentre asociada a un mayor desarrollo del metafiton que no solo favoreció la oferta de presas de mayor tamaño para su consumo (i.e. otros zoopláncteres y protistas) que utilizaran dichas matas como protección, sino que también les proveyó un refugio contra sus propios predadores (i.e. otros crustáceos e insectos). Estos impactos están dados tanto por las plantas acuáticas sumergidas como por el metafiton, que afectan positiva y negativamente a las demás comunidades acuáticas y a las propiedades físicas y químicas del agua (Scheffer *et al.* 1993).

La variación registrada en el zooplancton estuvo también determinada por el cambio en la abundancia de las larvas nauplii de los copépodos, que resultó mayor a tiempo final tanto en presencia de *L. fortunei* (**O+Lf**), como para mayores concentraciones de glifosato. A pesar de que otros trabajos indicaran que las larvas nauplii del copépodo *Cyclops vernalis* son afectadas frente a la exposición de herbicidas

(Robertson y Bunting 1976), y que por lo general los estadios larvales tienden a ser más sensibles a los agentes contaminantes, en nuestro experimento las larvas nauplii no parecieron estar negativamente afectadas por el glifosato. Al evaluar, sin embargo, el efecto de la interacción sobre los copépodos registramos a tiempo final una disminución de las larvas nauplii a mayores dosis de herbicida, que podría ser explicada por una mayor presión de predación de los cladóceros (que se volvieron más abundantes) sobre dichas larvas.

El impacto de los agentes de cambio en los ecosistemas depende de las características previas de cada uno de los sistemas. Es así que *L. fortunei* en escenarios con presencia del herbicida glifosato, impactará en función de las características previas y de la historia del cuerpo de agua donde actúa. Como ha sido observado por Cataldo *et al.* (2012a), en ambientes con presencia previa de inóculos de algunos tipos de cianobacterias, el impacto de *L. fortunei* en el ambiente favorece a grupos de cianobacterias como *Microcystis* spp., formadoras de floraciones potencialmente tóxicas. En nuestro experimento partimos de un sistema sin la previa presencia de este tipo de propágulos y, en función además de las características morfométricas de los dispositivos experimentales, el sistema viró hacia el desarrollo del metafiton, como evidencia del deterioro general de la calidad del agua.

El aumento en el PT generado por el aporte del glifosato tiene consecuencias importantes sobre el estado trófico del sistema y las comunidades que en él habitan puesto que el fósforo promueve la eutrofización de los cuerpos de agua (Vera *et al.* 2010, 2012). Como consecuencia se deteriora la calidad del agua, aumenta la turbidez, disminuye el oxígeno disuelto, aumenta la clorofila-*a* fitoplanctónica, se pierde biodiversidad con la modificación de la comunidad dominante y se promueve el desarrollo de cianobacterias potencialmente tóxicas (Istvánovics 2009, Quirós *et al.* 2002, Vera *et al.* 2010, 2012). En cuerpos de agua cercanos a zonas agrícolas, sometidos a recibir aporte de nutrientes debido al uso intensivo de agroquímicos como el glifosato, la presencia de la especie invasora de mejillón de agua dulce ampliamente distribuida en la cuenca del Plata, estaría actuando **sinérgicamente** con el herbicida haciendo biodisponible el fósforo aportado por el herbicida de una manera mucho mayor y más rápida, acelerando el proceso de eutrofización descrito por otros autores (Quirós *et al.* 2002, Vera *et al.* 2010) para las lagunas someras de la región pampeana.

En respuesta a las hipótesis planteadas en el presente capítulo, observamos que:

- (1) En presencia de *L. fortunei* la disipación del glifosato en la columna de agua fue más rápida, reduciendo la vida media del herbicida en 4 veces.
- (2) El efecto de la interacción de *L. fortunei* y del glifosato sobre la mayoría de las comunidades microbianas del sistema se encontró generalmente determinado por la presencia del mejillón. Sin embargo, los agentes de cambio afectaron sinérgicamente al bacterioplancton.
- (3) El efecto en la interacción de *L. fortunei* y del glifosato sobre las comunidades microbianas y la calidad del agua dulce dependió de la concentración de herbicida utilizada. Mayores dosis de herbicida generaron mayor concentración de fósforo total y disponibilidad de fosfato. A pesar de esto, el aumento en la turbidez, el seston, la clorofila-*a* del fitoplancton y la abundancia del bacterioplancton resultaron mayores a dosis baja y media de glifosato respecto a la dosis más alta.
- (4) La interacción de *Limnoperna fortunei* y del glifosato tuvo un mayor efecto en la calidad del agua del que se observó con cada agente por separado. El deterioro se evidenció con la aparición del metafiton más desarrollado en los escenarios de interacción, producto de la gran disponibilidad de nutrientes y las características del sistema.
- (5) Se evidenciaron cambios temporales diversos, según cada variable, en los distintos escenarios.

Conclusiones Generales

Conclusiones Generales

Los avances tecnológicos y científicos alcanzados durante el último milenio han ubicado al hombre en un lugar crítico de la historia. Los mecanismos de extracción y utilización de recursos naturales que se llevan a cabo en la actualidad superan ampliamente las herramientas y los conocimientos que poseemos para predecir el impacto a largo plazo sobre el ecosistema del cual dependemos (Twardowska 2004). Los agentes contaminantes no operan de manera aislada en el ambiente, sino que interactúan con las características del sistema y con otros factores de estrés ambiental. Para poder predecir con mayor grado de realismo el impacto de la interacción de factores de cambio sobre el ambiente, resulta sumamente importante evaluar el efecto no sólo a escala especie, población, y comunidad, sino también incluir estudios que involucren al ecosistema. Asimismo, introducir conceptos ecológicos en estudios de toxicidad asegura obtener conclusiones más realistas y robustas a la hora de entender cómo operan los contaminantes en ambientes naturales (Schmitt-Jansen *et al.* 2008), y tomar decisiones en función de ellos.

En la presente tesis evaluamos, mediante experimentos en microcosmos bajo condiciones controladas de laboratorio (Sección I) y de mayor volumen a la intemperie (Sección II), el efecto de la interacción de dos agentes de cambio ambiental introducidos por la actividad del hombre sobre ecosistemas de agua dulce. El herbicida glifosato, presente en diversos formulados comerciales, es ampliamente utilizado en nuestro país desde hace casi veinte años, debido a la introducción de cultivos genéticamente modificados (i.e. soja RR) y más recientemente a la práctica de siembra directa con barbecho químico. Los cuerpos de agua son susceptibles a recibir contaminación de grandes cantidades de glifosato que son dispersados sobre suelos, afectando organismos acuáticos no blanco (Pérez *et al.* 2007). Se han descrito serios problemas de eutrofización en ambientes lénticos como resultado del uso del formulado comercial Roundup® (a base de glifosato) debido al aporte de fósforo generado por la molécula de glifosato (Vera *et al.* 2010). Asimismo, se observó que el glifosato muchas veces favorece el desarrollo de cianobacterias que pueden ser tóxicas para el ambiente, deteriorando aún más el sistema en cuestión (Vera *et al.* 2010).

Por otro lado, el mejillón dorado de agua dulce, *Limnoperna fortunei*, aparece casi simultáneamente al glifosato, alcanzando las costas del Río de la Plata hace más de

veinte años debido al transporte marítimo intercontinental, convirtiéndose rápidamente en una especie invasora de ecosistemas lóticos y lénticos de la región. Las especies invasoras pueden interactuar fuertemente con otros agentes de estrés ambiental, modulando su efecto y pudiendo complicar su manejo (Strayer 2010). *Limnoperna fortunei* presenta una alta actividad filtradora que genera una mayor transparencia en la columna de agua y mineraliza nutrientes, volviéndolos disponible para su utilización por parte de las comunidades autótrofas. De acuerdo a las características del sistema (i.e. carga de nutrientes, turbidez, etc.), como a las comunidades autótrofas dominantes (i.e. fitoplancton, perifiton, macrófitas, etc.), van a verse favorecidos/perjudicados diferentes compartimentos ecológicos. En experimentos previos en mesocosmos se ha registrado un aumento de cianobacterias del género *Microcystis* spp. en presencia de *L. fortunei* (Cataldo *et al.* 2012a), mientras que en otro ambiente el mejillón favoreció el desarrollo de macrófitas sumergidas (Cataldo *et al.* 2012b). En nuestro experimento en microcosmos a la intemperie, en cambio, el mejillón estimuló el desarrollo del metafiton debido a las condiciones del ambiente, caracterizadas por una alta carga de nutrientes, alcalinidad, alta irradiancia lumínica y la presencia de sustratos que pudieran ser colonizados por dicha comunidad.

A partir de nuestros resultados, podemos decir que *Limnoperna fortunei* acelera la disipación del glifosato disuelto en agua a una tasa de hasta $50,2 \pm 3,4$ g por gramo de peso seco del tejido blando de mejillones por día, por efecto no sólo de su capacidad filtradora sino también debido a la interacción del herbicida con el biofilm de sus valvas. Esta aptitud podría resultar esperanzadora en función de un potencial uso como biorremediador, al menos en los cuerpos de agua colonizados por el molusco; no obstante, generaría una aceleración del deterioro del sistema debido al incremento en los nutrientes como producto de la degradación del herbicida. La interacción de ambos agentes provocó un efecto sinérgico en el ambiente que fue evidenciado a partir de un aumento en el fósforo reactivo soluble, un mayor desarrollo del bacterioplancton, una estimulación en el desarrollo de algas filamentosas y un aumento de la turbidez del sistema. Al igual que en otros experimentos realizados en micro y mesocosmos a escala ecosistémica, también nosotros encontramos que el glifosato deteriora la calidad del agua de forma significativa. En el caso de Pérez *et al.* (2007), corroborado por Vera *et*

al. (2010) se observó un aumento en la turbidez de los mesocosmos, debido particularmente al desarrollo de las picocianobacterias, con aguas con alto contenido en clorofila-*a* y gran cantidad de fósforo total, generando sistemas de mayor grado trófico. En cuerpos experimentales de menor tamaño, como los microcosmos utilizados en este experimento y también por Vera *et al.* (2012), el cambio se dio hacia la aparición y el desarrollo del metafiton. Esta comunidad puede formar matas macroscópicas de tamaño considerable, que desprendidas de sus sustratos, flotan y se acumulan en zonas de aguas quietas en sistemas someros. En épocas de elevadas temperaturas y radiación solar se descomponen rápidamente, con el consecuente deterioro de todo el sistema. Esta situación se agrava sustancialmente con la presencia de *Limnoperla fortunei*, quien facilita la disponibilidad de nutrientes y mejora sustancialmente las condiciones para que se desarrollen con más celeridad dichas algas macroscópicas. En cuerpos de agua someros, muy comunes en la cuenca del Plata bajo alto impacto agrícola, el efecto conjunto del glifosato y el mejillón puede tener severas consecuencias, modificando el estado trófico del sistema, afectando las comunidades asociadas y deteriorando la calidad del agua.

Los estudios multidisciplinarios y a diferentes escalas permiten acercarse a la realidad de una manera más completa. Los sistemas naturales y la evolución de los agentes de impacto en un determinado ambiente tienden a ser complejos. Como se evidencia en este trabajo, los factores de estrés ambiental interactúan en los sistemas, generando respuestas que son diferentes a las que se registran si se analizan sus componentes por separado. Resulta entonces sumamente importante que todas las partes involucradas en el análisis de los impactos antropogénicos en los ambientes (i.e. biólogos, toxicólogos, ingenieros ambientales) como en la utilización de los bienes y servicios ecosistémicos (organismos públicos tomadores de decisiones y los ciudadanos en general), tengan en cuenta la complejidad del tema. La comprensión de los efectos interactivos de múltiples agentes de cambio ambiental es un desafío de enorme importancia ya que de ellos pueden desprenderse respuestas emergentes y novedosas. Por esta razón y en función de los resultados de esta Tesis, recomendamos fuertemente la inclusión de estudios ecológicos a escala ecosistémica, y la interacción conjunta de diferentes disciplinas que puedan aportar y producir conocimiento más

robusto sobre cómo generar de manera conciente e inteligente, un uso más sustentable de los recursos y un impacto antropogénico más conservado.

Referencias bibliográficas

- Achiorno CL, de Villalobos C, Ferrari L (2008). Toxicity of the herbicide glyphosate to *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha). *Chemosphere*, 71: 1816-1822.
- Aizen MA, Garibaldi LA, Dondo M (2009). Expansión de la soja y diversidad de la agricultura argentina. *Ecología Austral*, 19: 45-54.
- Alberdi JL, Sáenz ME, Di Marzio WD, Tortorelli MC (1996). Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57: 229-235.
- Allen MB y Arnon DI (1955). Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena Cyllindrica* Lemm. *Plant Physiology*, 30(4): 366-372.
- Allende L, Tell G, Zagaresse H, Torremorell A, Pérez G, Bustingorry J, Escaray R, Izaguirre I (2009). Phytoplankton and primary production in clear-vegetated, inorganic-turbid, and algal-turbid shallow lakes from the Pampa plain (Argentina). *Hydrobiologia*, 624: 45-60.
- Altieri MA y Pengue W (2006). GM soybean: Latin America's new colonizer. *Seedling*, January issue.
- Amorós I, Alonso JL, Romaguera S, Carrasco JM (2007). Assessment of toxicity of a glyphosate-based formulation using bacterial systems in lake water. *Chemosphere*, 67: 2221-2228.
- APHA: American Public Health Association (2005). Standard methods for the examination of water and wastewaters. 21st edn; Centennial Edition. American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington DC, USA.
- Araújo ASF, Monteiro RTR, Abarkeli RB (2003). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52: 799-804.
- Attorney General of the State of New York, Consumer Frauds and Protection Bureau, Environmental Protection Bureau (1996). In the matter of Monsanto Company, respondent. Assurance of discontinuance pursuant to executive law § 63(15). New York, NY, Nov. False advertising by Monsanto regarding the safety of Roundup herbicide (glyphosate).
<http://www.mindfully.org/Pesticide/Monsanto-v-AGNYnov96.htm>
- Austin AP, Harris GE, Lucey WP (1991). Impact of an organophosphate herbicide (Glyphosates) on periphyton communities developed in experimental streams. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47: 29-35.
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology - Progress Series*, 10: 257-263.
- Barja BC y dos Santos Afonso M (1998). An ATR-FTIR study of glyphosate and its Fe(III) complex in aqueous solution. *Environmental Science and Technology*, 32: 3331-3335.
- Barja BC, Herszage J, dos Santos Afonso M (2001). Iron(III)-phosphonate complexes. *Polyhedron*, 20: 1821-1830.
- Barja BC y dos Santos Afonso M (2005). Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study. *Environmental Science and Technology*, 39: 585-592. <http://dx.doi.org/10.1021/es035055g>.
- Belaich M, Oliver C, Pilloff M, Porta A (2006). Evaluation of a biomarker of Cd(II) exposure on *Limnoperna fortunei*. *Environmental Pollution*, 144: 280-288.
- Bell SG y Codd GA (1996). Detection analysis and risk assessment of cyanobacterial toxins. En: Hester RE y Harrison RM (Ed.), *Agricultural chemicals and the environment. Issues in environmental science and technology*. N° 5. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 109-122 pp.
- Beninger PG y Decottignies P (2005). What makes diatoms attractive for suspensivores? The organic casing and associated organic molecules of *Coscinodiscus perforates* are quality cues for the bivalve *Pecten maximus*. *Journal of Plankton Research*, 27: 11-17.

- Biggs BJ y Close ME (1989). Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers: the relative effects of flows and nutrients. *Freshwater Biology*, 22: 209-231.
- Blackwell BD, Driscoll CT, Spada ME, Todorova SG, Montesdeoca MR (2013). Evaluation of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as biomonitors of mercury contamination in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(3): 638-43. doi: [10.1002/etc.2100](https://doi.org/10.1002/etc.2100).
- Boltovskoy D, Correa N, Cataldo D, Stripeikis J, Tudino M (1997). Environmental stress on *Corbicula fluminea* (Bivalvia) in the Paraná River delta (Argentina): complex pollution-related disruption of population structures. *Archives für Hydrobiologie*, 138(4): 483-507.
- Boltovskoy D y Cataldo D (1999). Population dynamics of *Limnoperna fortunei*, an invasive fouling mollusc, in the Lower Paraná river (Argentina). *Biofouling*, 14: 255-263.
- Boltovskoy D, Correa N, Cataldo D, Sylvester F (2006). Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata watershed and beyond. *Biological Invasions*, 8: 947–963. <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-005-5107-z>.
- Boltovskoy D, Karatayev A, Burlakova L, Cataldo D, Karatayev V, Sylvester F, Mariñelarena A (2009a). Significant ecosystem-wide effects of the swiftly spreading invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei*. *Hydrobiologia*, 636: 271-284.
- Boltovskoy D, Sylvester F, Otaegui A, Leites V, Cataldo D (2009b). Environmental modulation of reproductive activity of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* in South America: implications for antifouling strategies. *Ecología Austral*, 34: 719-730.
- Borchardt MA (1996). Nutrients. En: Stevenson RJ, Bothwell ML, Lowe RL (Eds.). *Algal ecology; Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA, pp 183-227.
- Bourrelly P (1990). *Les Algues d'Eau Douce*. Tome I. Les Algues Vertes. Second Edition. N. Boubée et Cie, Paris. 576 pp.
- Brandt KK, Jørgensen NOG, Nielsen TH, Winding A (2004). Microbial community-level toxicity testing of linear alkylbenzene sulfonates in aquatic microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 229-241.
- Bricheux G, Le Moal G, Hennequin C, Coffe G, Donnadiou F, Portelli C, Bohatier J, Forestier C (2013). Characterization and evolution of natural aquatic biofilm communities exposed in vitro to herbicides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88: 126-134.
- Bykova O, Laursen A, Bostan V, Bautista J, McCarthy L (2006). Do zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) alter lake water chemistry in a way that favours *Microcystis* growth? *Science of the Total Environment*, 371: 362-372.
- Callieri C (2007). Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews*, 1: 1-28.
- Camusso M, Balestrini R, Binelli A (2001). Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere*, 44(2): 263-270.
- Carmichael WW (1994). The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*, 270: 78-86.
- Carreño LV, Viglizzo EF (2007). *Provisión de Servicios Ecológicos y Gestión de los Ambientes Rurales en Argentina*. Área Estratégica de Gestión Ambiental. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina, 68 pp.
- CASAFE (2010). *Cámara de Sanidad, y Fertilizantes*. Informe de Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios, año 2010. Buenos Aires, Argentina.
- Castro Jr. JV, Peralba MC, Ayub MA (2007). Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 42 (8): 883-886.

- Cataldo D, Colombo JC, Boltovskoy D, Bilos C, Landoni P (2001). Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. *Environmental Pollution*, 112: 379-389.
- Cataldo D, Boltovskoy D, Pose M (2003). Toxicity of chlorine and three nonoxidizing molluscicides to the pest mussel *Limnoperna fortunei*. *Journal AWWA*, 95(1): 66-78.
- Cataldo D, Vinocur A, O'Farrell I, Paolucci E, Leites V, Boltovskoy D (2012a). The introduced bivalve *Limnoperna fortunei* boosts *Microcystis* growth in Salto Grande reservoir (Argentina): evidence from mesocosm experiments. *Hydrobiologia*, 680: 25-38. doi: [10.1007/s10750-011-0897-8](https://doi.org/10.1007/s10750-011-0897-8)
- Cataldo D, O'Farrell I, Paolucci E, Sylvester F, Boltovskoy D (2012b). Impact of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*) on phytoplankton and nutrient cycling. *Aquatic Invasions*, 7: 91-100.
- CCM International (2011). Outlook for China Glyphosate Industry 2012-2016.
- Cedergreen N (2008). Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time? *Environmental Pollution*, 156(3): 1099-110.
- Cedergreen N y Olesen ChF (2010). Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3): 140-148.
- Chen CY, Hathaway KM, Folt CL (2004). Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4): 823-831.
- Christensen MR, Graham MR, Vinebrooke RD, Findlay DL, Paterson MJ, Turner MA (2006). Multiple anthropogenic stressors cause ecological surprises in boreal lakes. *Global Change Biology*, 12(12): 2316-2322.
- Clair E, Linn L, Traver C, Amiel C, Séralini GE, Panoff JM (2012). Effects of Roundup and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Current Microbiology*, 64: 486-491. doi: [10.1007/s00284-012-0098-3](https://doi.org/10.1007/s00284-012-0098-3)
- CNIA-CONICET (2009). Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. 130 pp.
- Colombo JC, Bilos C, Campanaro M, Rodríguez Presa MJ, Catoggio JA (1995). Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides by the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: its use as sentinel organism in the Río de la Plata estuary, Argentina. *Environmental Science and Technology*, 29: 914-927.
- Contardo-Jara V, Klingelmann E, Wiegand C (2009a). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157(1): 57-63.
- Contardo-Jara V, Galanti LN, Amé MV, Monferrán MV, Wunderlin DA, Wiegand C (2009b). Biotransformation and antioxidant enzymes of *Limnoperna fortunei* detect site impact in water courses of Córdoba, Argentina. *Ecotoxicological Environmental Safety*, 72: 1871-1880. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.07.001>.
- Conroy J, Edwards WJ, Pontius RA, Kane DD, Zhang H, Shea JF, Richey JN, Culver DA (2005). Soluble nitrogen and phosphorus excretion of exotic freshwater mussels (*Dreissena spp.*): potential impacts for nutrient remineralisation in western Lake Erie. *Freshwater biology*, 50: 1146-1162.
- Cordeiro ML, Pompiano DL, Frost JW (1986). Degradation and detoxification of organophosphonates: cleavage of the carbon to phosphorus bond. *Journal of American Chemical Society*, 108(2): 332-334.
- Crosby AF (1986). Ecological Imperialism. The biological expansion of Europe, 900-1900. Cambridge University Press. 390 pp.

- Darrigran y Damborenea (2006). Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano / Gustavo Darrigran y Cristina Damborenea - 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 226 pp.
- de Cabo L, Puig A, Arreghini S, Olgúin HF, Seoane R, Obertello I (2003). Physicochemical variables and plankton from the Lower Delta of the Paraná River (Argentina) in relation to flow. *Hydrological Processes*, 17: 1279-1290.
- Di Fiori E, Pizarro H, dos Santos Afonso M, Cataldo D (2012). Impact of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on glyphosate concentration in water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81: 106-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.024>
- Dill GM (2005). Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science*, 61: 219-224.
- Dillon Jr. RT (2004). The ecology of freshwater molluscs. Department of Biology, College of Charleston. Cambridge University Press, United Kingdom. 509 pp.
- do Carmo Langiano V y Martinez CBR (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C(147): 222-231.
- Doherty FG (1990). The Asiatic clam, *Corbicula* spp., as a biological monitor in freshwater environments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 15: 143-181.
- Downing JA y McCauley E (1992). The nitrogen:phosphorus relationship in lakes. *Limnology and Oceanography*, 37(5): 936-945.
- Dreher Mansur MC, Pinheiro dos Santos C, Pereira D, Padula Paz IC, Leite Zurita ML, Raya Rodriguez MT, Vilar Nehrke M, Aydos Bergonci PE (2012). Moluscos límnicos invasores no Brasil: biología, prevenção e controle. Redes Editora. Porto Alegre, Brasil. 412pp.
- Dukatz F, Ferrari R, Canziani G (2006). Evaluación de sistemas lacunares bonaerenses mediante imágenes Landsat TM. *Biología Acuática*, 22: 95-101.
- Dutra BK, Fernandes FA, Failace DM, Oliveira GT (2011). Effect of Roundup® (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicology*, 20: 255-263.
- EPA: Environmental Protection Agency, U.S. EPA (1993). R.E.D. Facts: Glyphosate [Glifosato: hechos esenciales sobre la decisión de un nuevo registro]. EPA-738-F-93-011. Washington, D.C. http://www.epa.gov/oppsrrd1/ards/old_reds/glyphosate.pdf
- Fields DM y Yen J (1997). The escape behavior of marine copepods in response to a quantifiable fluid mechanical disturbance. *Journal of Plankton Research*, 19(9): 1289-1304.
- Filser J (2008). Ecotoxicology and ecosystems: Relevance, restrictions, research needs. *Basic and Applied Ecology*, 9: 333-336.
- Fishman DB, Adlerstein SA, Vanderploeg HA, Fahnenstiel GL, Scavia D (2009). Causes of phytoplankton changes in Saginaw Bay, Lake Huron, during the zebra mussel invasion. *Journal of Great Lakes Research*, 35: 482-495.
- Folmar LC, Sanders HO, Julin AM (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 8: 269-278.
- 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 Physiology*, 49(3): 443-456.
- Franz JE, Mao MK, Sikorski JA (1997). Glyphosate. A unique global herbicide. American Chemistry Society, ASC Monographs 189: 1-600.
- Frau D, Rojas Molina F, Devercelli M, José de Paggi (2012). The effect of an invading filter-feeding bivalve on a phytoplankton assemblage from the Paraná system: a mesocosm experiment. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1080/10236244.2012.735419>

- Fritz LW, Ragone LM, Lutz RA, Swap S (1990). Biomineralization of barite in the shell of the freshwater Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Mollusca: Bivalvia). *Limnology & Oceanography*, 35 (3): 756-762.
- Gardner SC, Grue CE, Grassley JM, Lenz LA, Lindenauer JM, Seeley ME (1997). Single species algal (*Ankistrodesmus*) toxicity tests with Rodeo® and Garlon® 3A. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 492-499.
- Garthwaite DG, Barker I, Parrish G, Smith L, Chippindale C, Pietravalle S (2010). Pesticide Usage Survey Report 235: Arable Crops In The United Kingdom 2010. Food & Environment Research Agency, DEFRA, UK. Table 5.
- Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon MC, Séralini GE (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262: 184-191.
- Giesy JP, Dobson S, Solomon KR (2000). Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167: 35-120.
- Gimsing AL, Borggaard OK (2002). Competitive adsorption of glyphosate and phosphate on clay minerals and oxides. *Clay Minerals*, 37: 509-515.
- Gimsing AL y dos Santos Afonso M (2005). Glyphosate. En: Nowack B, VanBriesen JM (Eds). *Biogeochemistry of Chelating Agents*. ACS Symposium Series 910, American Chemical Society, Washington DC, USA, pp. 263-277.
- Gluszczak L, dos Santos Miron D, Crestani M, Braga da Fonseca M, de Araújo Pedron F, Frescura Duarte M, Pimentel Vieira VL (2006). Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65: 237-241.
- Goldsborough LG y Brown DJ (1988). Effect of glyphosate (roundup formulation) on periphytic algal photo-synthesis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41: 253-260.
- Goldsborough LG y Beck AE (1989). Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18: 537-544.
- Goldsborough LG y Brown DJ (1993). Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 1139-1147.
- Goldsborough LG y Robinson GGC (1996). Pattern in Wetlands. En: Stevenson RJ, Bothwell ML y Lowe RL (Eds). *Algal Ecology. Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press, USA, pp 77-117.
- Goldsborough LG, Mc Dougal RL, North AK (2005). Periphyton in freshwater lakes and wetlands. En: Azim ME, Verdegem MCJ, van Dam AA, Beveridge MCM (Eds). *Periphyton Ecology, Exploitation and Management*. CABI Publishing, Cambridge, pp 71-83.
- Gustavson K, Mohlenberg F, Schluter L (2003). Effects of exposure duration of herbicides on natural stream periphyton communities and recovery. *Archives of Environment Contamination and Toxicology*, 45: 48-98.
- Heath RT, Fahnenstiel GL, Gardner WS, Cavaletto JF, Hwang SJ (1995). Ecosystem-level effects of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): and enclosure experiment in Saginaw Bay, Lake Huron. *Journal of Great Lakes Research* 21: 501-516. [http://dx.doi.org/10.1016/S0380-1330\(95\)71062-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0380-1330(95)71062-0)
- Hilderbrand RL (1983). *The role of phosphonates in living systems*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA.
- Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoen N (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 1928-1938.

- Istvánovics V (2009). Eutrophication of Lakes and Reservoirs. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Encyclopedia of Inland Waters*, 157-165.
- Informe INTA 2011. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Siembra Directa. Actualización Técnica N°58. Febrero 2011. 28 pp.
- Informe INTA 2012. Guía para el uso adecuado de plaguicidas y la correcta disposición de sus envases. Por Silvia Fanny Martens. Boletín de divulgación N° 41. [ISSN 0328-3380](#).
- Iummato MM, Di Fiori E, Sabatini SE, Cacciatore LC, Cochón AC, Ríos de Molina MC, Juárez AB (2013). Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95: 123-129.
- James C (2009). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009. ISAAA. Brief No. 41. ISAAA: Ithaca, NY.
- Juhel G, Davenport J, O'Halloran SC, Culloty RM, O'Riordan KF, James A, Furey A, Allis O (2006). Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*: a bioenergetics approach. *Aquatic Toxicology*, 79: 391-400.
- Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grams S, Pokethitiyook P (2002). Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia*, 28: 121-127.
- Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grams S, Pokethitiyook P (2003). Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*, 18: 260-267.
- José de Paggi S y Paggi JC (1995). Determinación de la abundancia y biomasa zooplanctónica. En: Lopretto, E. C. y Tell, G. (eds.). Ecosistemas de aguas continentales. Metodología para su estudio. Volumen I. La Plata, Ediciones Sur. pp. 315-323.
- Kalff J (2002). Limnology, Inland Water Ecosystems. Prentice Hall, New Jersey, 592 pp.
- Karatayev AY, Burlakova, L. E. y Padilla, D. K. (1997). The Effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) Invasion on aquatic communities in Eastern Europe. *Journal of Shellfish Research*, 16: 187-203.
- Karatayev AY, Burlakova LE, Padilla DK (2003). Impacts of zebra mussels on aquatic communities and their role as ecosystem engineers. In Leppäkoski E, Gollasch S & Olenin S (Eds.), Invasive aquatic species of Europe—distribution impacts and management. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 433-446.
- Karatayev AY, Padilla DK, Minchin D, Boltovskoy D, Burlakova LE (2006). Changes in global economies and trade: the potential spread of exotic freshwater bivalves. *Biological Invasions*, 9: 161-180.
- Karatayev AY, Boltovskoy D, Padilla DK, Burlakova LE (2007). The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasión impacts. *Journal of Shellfish Research*, 26(1): 205–213.
- Kelly MG y Whitton BA (1998). Biological monitoring of eutrophication in rivers. *Hydrobiologia*, 384: 55-67.
- Kelly DW, Poulin R, Tompkins DM, Townsend CR (2010). Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *Journal of Applied Ecology*, 47: 498–504.
- Koerselman W y Meuleman AFM (1996). The Vegetation N:P Ratio: a New Tool to Detect the Nature of Nutrient Limitation. *Journal of Applied Ecology*, 33: 1441-1450.
- Kononova SV y Nesmeyanova MA (2002). Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry*, 67 (2): 184-195.
- Lajmanovich RC, Peltzer PM, Cabagna MC, Attademo AM, Junges CM (2011). Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors. *Archives of*

- Environmental Contamination and Toxicology*, 60(4): 681-9. doi: [10.1007/s00244-010-9578-2](https://doi.org/10.1007/s00244-010-9578-2)
- Lampert W y Sommer U (1997). Limnoecology: The ecology of lakes and streams. Oxford University Press, New York, 382 pp.
 - Lavrentyev P, Gardner W, Cavaletto J, Beaver J (1995) Effects of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) on protozoa and phytoplankton from Saginaw Bay, Lake Huron. *Journal of Great Lakes Research*, 21: 545-57.
 - Leguizamón 2009. Revista AgroMensajes de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, 04/2009. ISSN: 16698584. <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/27/7AM27.htm>
 - Liong PC, Hamzah WP, Murugan V (1988). Toxicity of some pesticides towards freshwater fishes. *Malaysian Agricultural Journal*, 54: 147–156.
 - Liphadzi KB, Al-Khatib K, Bensch CN, Stahlman PW, Dille JA, Todd T, Rice CW, Horak MJ, Head G (2005). Soil microbial and nematode communities as affected by glyphosate and tillage practices in a glyphosate-resistant cropping system. *Weed Science*, 53 (4): 536–545. <http://dx.doi.org/10.1614/WS04-129R1>.
 - Lipok J, Owsiak T, Mlynarz P, Forlani G, Kafarski P (2007). Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates—The ability of *Spirulina* spp. to degrade glyphosate. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 286-291.
 - Liu CM, McLean PA, Sookdeo CC, Cannon FC (1991). Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1799-1804.
 - Lorenzen CJ (1967). Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnology & Oceanography*, 12: 343-346.
 - Lowe RL y Pan Y (1996). Benthic algal communities as biological monitors. En: Stevenson RJ, Bothwell ML, Lowe RL (Ed.) *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA, 705-740 pp.
 - Lowe RL y Pillsbury RW (1995). Shifts in benthic algal community structure and function following the appearance of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in Saginaw Bay, Lake Huron. *Journal of Great Lakes Research* 21: 558-566.
 - Lydon J y Duke SO (1988). Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 813-818.
 - Mackereth FJH, Heron J y Talling JF (1978). Water analysis: some revised methods for limnologists. *Scientific Publications of the Freshwater Biological Association*, 36: 1-120.
 - Mann RM y Bidwell JR (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36: 193-199.
 - Marker AFH, Nusch A, Rai H, Riemann B (1980). The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Archiv für Hydrobiologie e Beihefte Ergebnisse Limnology*, 14: 91-106.
 - Maule A y Wright SJL (1984). Herbicide effects on the population growth of some green algae and cyanobacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 57: 369-379.
 - Menéndez Helman RJ, Ferreyroa GV, dos Santos Afonso M, Salibián A (2012). Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88:6-9. doi: [10.1007/s00128-011-0423-8](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0423-8)
 - Menéndez Helman RJ (2013). Efectos del glifosato en peces dulceacuícolas. Biomarcadores de estrés ambiental. Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires.

- Meyer DE y Cederberg C (2010). Pesticide use and glyphosate-resistant weeds – a case study of Brazilian soybean production. SIK-Rapport Nr 809. 54 pp. ISBN 978-91-7290-298-5.
- Miljøstyrelsen, Danish Ministry of the Environment (2010) Annual Pesticides Statistics 2009. <http://www.mst.dk/English/Pesticides/Pesticides+statistics/Farmers+etc/>
- Millennium Ecosystem Assessment (2005). Informes en la página de la UNEP, United Nations Environment Programme. <http://www.unep.org/maweb/en/Condition.aspx>
- Miller EB y Watzin MC (2007). The effects of zebra mussels on the lower planktonic foodweb in Lake Champlain. *Journal of Great Lakes Research*, 33: 407-420.
- Moore GF, Dunsmore BC, Jones SM, Smejkal CW, Jass J, Stoodley P, Lappin-Scott HM (2000). Microbial detachment from biofilms. En: Allison D, Gilbert P, Lappin-Scott H, Wilson M (Eds.), SGM symposium 59: Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge University Press, pp. 107-127.
- Mottier A, Kientz-Bouchart V, Serpentine A, Lebel JM, Jha AN, Costil K (2013). Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea giga*. *Aquatic Toxicology*, 128-129: 67-78.
- Mugni H, Jergentz S, Schulz R, Maine A, Bonetto C (2005). Phosphate and nitrogen compounds in streams of Pampean Plain areas under intensive cultivation (Buenos Aires, Argentina). En: Serrano H, Golterman HL (Ed.), Phosphates in sediments. Backhuys Publishers, The Netherlands, 163-170 pp.
- Naddafi R (2007). The invasion of the Zebra Mussel - effects on phytoplankton community structure and ecosystem function. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, 361, 54 pp. Uppsala. ISBN 978-91-554-7015-9.
- Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, López SL, Carrasco AE (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology*, 23 (10): 1586-1595. <http://dx.doi.org/10.1021/tx1001749>.
- Pastorino G, Darrigran G, Martin S, Lunaschi L (1993). *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1957) (Mytilidae) nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. *Neotropica*, 39: 101-102.
- Pengue W, Monterroso I y Binimelis R (2009). Bioinvasiones y bioeconomía: El caso del sorgo de alepo resistente al glifosato en la agricultura argentina. Guatemala. Instituto de Ciencias y Tecnología Ambientales, (ICTA) (UAB)/ Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales,(FLACSO-Guatemala)/ Grupo de Ecología del Paisaje y Medio Ambiente (GEPAMA) /(UBA) 2009. 106 pp.
- Pérez GL, Torremorell A, Mugni H, Rodríguez P, Vera MS, Do Nascimento M, Allende L, Bustingorry J, Escaray R, Ferraro M, Izaguirre I, Pizarro H, Bonetto C, Morris DP, Zagarese H (2007). Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications*, 17: 2310-2322. <http://dx.doi.org/10.1890/07-0499.1>.
- Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156: 61–66.
- Pesce S, Fajon C, Bardot C, Bonnemoy F, Portelli C, Bohatier J (2008). Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. *Aquatic Toxicology*, 86: 352-360.
- Pesce S, Batisson I, Bardot C, Fajon C, Portelli C, Montuelle B, Bohatier J (2009). Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1905-1912.
- Pessagno RC, Torres Sanchez RM, dos Santos Afonso M (2008). Glyphosate behavior at soil and mineral-water interfaces. *Environmental Pollution*, 153: 53-59.

- Peterson RKD y Hulting A (2004). A comparative ecological risk assessment for herbicides used on spring wheat: the effect of glyphosate when used within a glyphosate-tolerant wheat system. *Weed Science*, 52: 834-844.
- Peterson HG, Boutin C, Martin PA, Freemark KE, Ruecker NJ, Moody MJ (1994). Aquatic phytotoxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicology*, 28: 275-292.
- Piggott JJ, Lange K, Townsend CR, Matthaei CD (2012). Multiple stressors in agricultural streams: a mesocosm study of interactions among raised water temperature, sediment addition and nutrient enrichment. *PLoS ONE* 7(11): e49873. [doi:10.1371/journal.pone.0049873](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049873).
- Pizarro H, Alemanni ME (2005). Variables físicas y químicas y biomasa del perifiton del tramo inferior del Río Luján (Pcia. de Buenos Aires) con distintos niveles de polución orgánica. *Ecología Austral*, 15(1): 73-88.
- Powell HA, Kerby NW, Rowell P (1991). Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. *New Phytologist*, 119: 421-426. [doi:10.1111/j.1469-8137.1991.tb00042.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00042.x)
- Qiu H, Geng J, Ren H, Xia X, Wang X, Yu Y (2013). Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup® formulation. *Journal of Hazardous Materials*, 248-249: 172-176
- Quinn JP, Kulakova AN, Cooley NA, McGrath JW (2007). New ways to break an old bond: the bacterial carbon-phosphorous hydrolases and their role in biogeochemical phosphorous cycling. *Environmental Microbiology*, 9(10): 2392-2400.
- Quirós R, Rennella AM, Boveri MB, Rosso JJ y Sosnovsky A (2002). Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral*, 12: 175-185.
- Ramankutty N, Foley JA, Olejniczak NJ (2002). People on the land: changes in population and global croplands during the 20th century. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(3): 251-257.
- Ravi V y Balakumar T (1998). Biodegradation of the C-P bond in glyphosate by the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 57: 790-794.
- Redfield AC (1934). On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. En: Daniel RJ (Ed.) James Johnstone Memorial Volume. University Press of Liverpool, pp. 176-192.
- Relyea RA, Schoeppner NM, Hoverman JT (2005). Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications*, 15: 1125-1134. <http://dx.doi.org/10.1890/04-0559>.
- Relyea RA (2005a). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, 15(2): 618-627. <http://dx.doi.org/10.1890/03-5342>.
- Relyea RA (2005b). The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15 (4): 1118–1124.
- Relyea RA (2006). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, 16: 2027-2034. <http://dx.doi.org/10.1890/04-1291>.
- Relyea RA y Hoverman JT (2008). Interactive effects of predators and a pesticide on aquatic communities. *Oikos*, 117: 1647-1658. [doi: 10.1111/j.1600-0706.2008.16933.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.16933.x)
- Reynolds CS (2006). The Ecology of Phytoplankton. Cambridge University Press, USA, 535 pp (p. 164).
- Robertson EB y Bunting DL (1976). The acute toxicity of four herbicides to 0–4 hour nauplii of *Cyclops vernalis* Fisher (Copepoda, Cyclopoida). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 16(6): 682-688.

- Rojas Molina F y José de Paggi S (2008). Zooplankton in the Paraná River floodplain (South America) before and after the invasion of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia). *Wetlands*, 28: 695-702.
- Rojas Molina F, Paggi JC, Devercelli M (2010). Zooplanktophagy in the natural diet and selectivity of the invasive mollusk *Limnoperna fortunei*. *Biological Invasions*, 12: 1647-1659. doi 10.1007/s10530-009-9578-1
- Rojas Molina F, José de Paggi S, Boltovskoy D (2011). Vulnerability of microcrustaceans to predation by the invasive filter-feeding mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 44(6): 329-338.
- Romano MA, Romano RM, Dalazen Santos L, Wisniewski P, Campos DA, Bargi de Souza P, Viau P, Bernardi MM, Nunes MT, Alvarenga de Oliveira C (2012). Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Archives of Toxicology*, 86(4): 663-673.
- Romero DM, Ríos de Molina MC, Juárez AB (2011). Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4): 741-7.
- Ronco AE, Carriquiriborde P, Natale GS, Martin ML, Mugni H, Bonetto C (2008). Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pamasic Region. In: Chen J, Guo C (Eds.) *Ecosystem ecology research trends*, pp. 209-239.
- Rueppel ML, Brightwell BB, Schaefer S, Marvel JT (1977). Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25: 517-528.
- Sabater S, Guasch H, Ricart M, Romaní A, Vidal G, Klünder C, Schmitt-Jansen M (2007). Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4): 1425-1434.
- Salisbury FB y Ross CW (1994). *Fisiología vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica, México, DF.
- Saxton MA, Morrow EA, Bourbonniere RA, Wilhelm SW (2011). Glyphosate influence on phytoplankton community structure in Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research*, 37: 683-690.
- Schaffer JD y Sebetich MJ (2004). Effects of aquatic herbicides on primary productivity of phytoplankton in the laboratory. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72: 1032-1037.
- Scheffer M, Hosper SH, Meijer ML, Moss B (1993). Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(8): 275-279.
- Schindler DW (1987). Detecting ecosystem responses to anthropogenic stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(S1): s6-s25.
- Schmitt-Jansen M, Veit U, Dudel G, Altenburger R (2008). An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology*, 9: 337-345.
- Schneider SH y Root TL (2013). Climate Change and Ecology, Synergism of. *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)*, 58-72.
- Seralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, Spiroux de Vendômois J (2012). Long term toxicity of a roundup herbicide and a roundup-tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 4221-4231.
- Solomon KR, Anadón A, Carrasquilla G, Cerdeira AL, Marshall J, Sanin LH (2007). Coca and poppy eradication in Colombia: environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 190: 43-125.
- Southam CM y Erlich J (1943). Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*, 33: 517-524.

- Springett JA y Gray RAJ (1992). Effect of repeated low doses of biocides on the earthworm *Apporectodea caliginosa* in laboratory culture. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 1739-1744.
- Steinmann HH, Dickeduisberg M, Theuvsen L (2012). Uses and benefits of glyphosate in German arable farming. *Crop Protection*, 42: 164-169.
- Stevenson RJ 1996. An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats in: *Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems*. Stevenson RJ, Bothwell ML y Lowe RL (Eds.). Academic Press, UK, pp 1-30.
- Strayer DL (2010). Alien species in fresh waters: ecological effects, interactions with other stressors, and prospects for the future. *Freshwater Biology*, 55(1): 152-174. [doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02380.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02380.x)
- Sylvester F, Dorado J, Boltovskoy D, Juárez A, Cataldo D (2005). Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. *Hydrobiologia*, 534: 71–80.
- Sylvester F, Boltovskoy D, Cataldo D (2007). The invasive bivalve *Limnoperna fortunei* enhances benthic invertebrate densities in South American floodplain rivers. *Hydrobiologia*, 589: 15–27. [doi: 10.1007/s10750-007-0708-4](https://doi.org/10.1007/s10750-007-0708-4)
- Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, Terech-Majewska E, Banaszkiwicz T (2000). Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in crap (*Cyprinus cRIOio*). *Marine Environmental Research*, 50: 263-266.
- Tate U, Whatley A, Clugston M (1997). Sources and outcomes of job tension: a three-nation study. *International Journal of Management*, 14: 350-358.
- Taylor JD y Layman M (1972). The mechanical properties of bivalve (Mollusca) shell structures. *Paleontology*, 15 (1): 73–87.
- Thomsett Herbert L (2013). Evaluación de los efectos del glifosato sobre la conducta de la abeja *Apis mellifera*. Grupo de estudios de Insectos Sociales. IFIBYME-CONICET. Depto DBBE, FCEyN, UBA. Trabajo de Seminario para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas.
- Townsend CR, Uhlmann SS, Matthaei CD (2008). Individual and combined responses of stream ecosystems to multiple stressors. *Journal of Applied Ecology*, 45: 1810–1819. [doi: 10.1111/j.1365-2664.2008.01548.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01548.x)
- Trigo EJ y Cap EJ (2006). Diez años de cultivos transgénicos en la agricultura Argentina. ArgenBio, Buenos Aires, 53 pp.
- Trinelli MA, Cantera G, dos Santos Afonso M (2012). Estudios de fotodegradación de glifosato en medio acuoso. En: dos Santos Afonso M y Torres Sánchez RM (Eds.), *Ciencia y Tecnología Ambiental. Un enfoque integrador*. Editorial AAPC. Buenos Aires.
- Tsui MTK y Chu L (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environment factors. *Chemosphere*, 52: 1189-1197.
- Tsui MTK, Wang WX, Chu LM (2005). Influence of glyphosate and its formulation (Roundup®) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution*, 138: 59-68.
- Tsui MTK y Chu L (2008). Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup®) in a subtropical wetland. *Chemosphere*, 71: 439-446.
- Twardowska I (2004). Ecotoxicology, environmental safety, and sustainable development-challenges of the third millennium. Editorial. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58: 3-6.
- Utermöhl H (1958). Zur vervollkommung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung fur Limnologie*, 9: 1-38.
- Vadeboncoeur Y y Steinman A (2002) Periphyton function in lake ecosystems. *The Scientific World Journal*, 2:1449–1468. [doi:10.1100/tsw.2002.294](https://doi.org/10.1100/tsw.2002.294)

- Vanderploeg HA, Liebig JR, Carmichael WW, Agy MA, Johengen TH, Fahnenstiel GL, Nalepa TF (2001). Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic *Microcystis* blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 58 (6): 1208–1221.
- Venrick EL (1978). How many cells to count? Sournia A (Ed.). *Phytoplankton manual*, UNESCO, Paris, France, 167-180 pp.
- Vera MS (2011). Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce. Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires.
- Vera MS, Lagomarsino L, Sylvester M, Pérez GL, Rodríguez, P, Mugni H, Sinistro R, Ferraro M, Bonetto C, Zagarese H, Pizarro H (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19: 710–721. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-009-0446-7>.
- Vera MS, Di Fiori E, Lagomarsino L, Sinistro R, Escaray R, Iummato MM, Juárez A, Río MC, Tell G, Pizarro H (2012). Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology*, 21: 1805-1816.
- Villar C, Stripeikis J, D’Huicque L, Tudino M, Troccoli O, Bonetto (1999). Cd, Cu and Zn concentrations in sediments and the invasive bivalves *Limnoperna fortunei* and *Corbicula fluminea* at the Río de la Plata basin, Argentina. *Hydrobiologia*, 416: 41-49.
- Villela IV, Oliveira IM, Silva J, Henriques JAP (2006). DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research*, 697: 78-86.
- Villela IV, Oliveira IM, Coelho Silveira J, Ferraz Dias J, Henriques JAP, Silva J (2007). Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research*, 628: 76–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.12.001>.
- Volesky B (2003). Sorption and Biosorption. BV Sorbex Inc. (Eds.), Canadá, 316 pp.
- Wang YS, Jaw CG, Chen YL (1994). Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth. *Water, Air, and Soil Pollution*, 74(3-4): 397-403.
- Wetzel RG (1983). Opening remarks. En: Wetzel RG (Ed.) *Periphyton of freshwater ecosystems*. Dr. W Junk Publishers, The Hage, Netherlands, pp 3-4.
- Wetzel RG (2001). *Limnology, Lake and River Ecosystems*, Third Edition, Elsevier Academic Press, USA, 1006 pp.
- WHO (1994). Environmental Health Criteria 159: Glyphosate. World Health Organization. Geneva, Switzerland. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>
- Widenfalk A, Bertilsson S, Sundh I, Goedkoop W (2008). Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes – responses at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution*, 152: 576-584.
- Williams GM, Kroes R, Munro IC (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31: 117–165. <http://dx.doi.org/10.1006/rtph.1999.1371>.
- Wilson AE (2003). Effects of zebra mussels on phytoplankton and ciliates: a field mesocosm experiment. *Journal of Plankton Research*, 25(8): 905-915.
- Wimpenny J (2000). An overview of biofilms as functional communities. En: Allison D, Gilbert P, Lappin-Scott H, Wilson M (Eds.), *SGM symposium 59: Community structure and co-operation in biofilms*. Cambridge University Press, pp. 1-24.

Referencias bibliográficas

- Wong P (2000). Effect of 2, 4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*, 41: 177-182.
- Yadav SS, Giri S, Singha U, Boro F, Giri A (2013). Toxic and genotoxic effects of Roundup on tadpoles of the Indian skittering frog (*Euflyctis cyanophlyctis*) in the presence and absence of predator stress. *Aquatic Toxicology*, 132-133: 1-8.
- Zar JH 1996. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey, USA, 662p.
- Zouaoui K, Dulaurent S, Gaulier JM, Moesch C, Lachâtre G (2013). Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. *Forensic Science International*, 226 (1-3): e20-e25.