

Tesis de Maestría

Análisis de la composición bacteriana del biofilm asociado a las valvas de *Limnoperna fortunei* y su papel en la degradación del glifosato en agua

Florez Vargas, Ruth Patricia

2016

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:

Florez Vargas, Ruth Patricia. (2016). Análisis de la composición bacteriana del biofilm asociado a las valvas de *Limnoperna fortunei* y su papel en la degradación del glifosato en agua.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5949_FlorezVargas

Cita tipo Chicago:

Florez Vargas, Ruth Patricia. "Análisis de la composición bacteriana del biofilm asociado a las valvas de *Limnoperna fortunei* y su papel en la degradación del glifosato en agua". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5949_FlorezVargas

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Análisis de la composición bacteriana del biofilm asociado a las valvas de *Limnoperna fortunei* y su papel en la degradación del glifosato en agua.

Tesis presentada para optar por el título de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Ciencias ambientales

Biol. RUTH PATRICIA FLOREZ VARGAS

Director de Tesis: Dr. Daniel Cataldo

Codirectora: Dra. Irina Izaguirre

Ciudad Autónoma de Buenos Aires

2016

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
SUMARY	iii
AGRADECIMIENTOS	v
INTRODUCCIÓN	1
<i>Limnoperna fortunei</i> (Dunker 1857)	3
Características y expansión	3
Ciclo de vida	8
Impacto en el ecosistema	10
Glifosato	13
Glifosato en los cuerpos de agua	15
Efectos del glifosato en los organismos	18
Biofilms bacterianos	21
Grupos bacterianos degradadores de glifosato	22
Análisis de grupos bacterianos	24
Bacterias del ecosistema de agua dulce	25
Objetivos e hipótesis del estudio	29
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Experimento de exposición de <i>Limnoperna fortunei</i> al glifosato	31
Determinación de nutrientes	33
Determinación de glifosato	33
Vida media del glifosato	34
Tasa de degradación del glifosato	34
Cuantificación e identificación de grupos de bacterias presentes en el biofilm, mediante la técnica de CARD-FISH	35
Obtención y fijación de las muestras	35
Hibridación de las muestras empleando CARD-FISH	36
Cálculo de la superficie de las valvas	37
Tratamiento estadístico	38
RESULTADOS	40
Características físicas y químicas del agua	40
Concentración de glifosato	40
Concentración de AMPA (ácido aminometilfosfónico)	41

Vida media del glifosato	42
Tasa de disipación de glifosato.....	43
Fosfatos (P-PO ₄).....	43
Nitratos (N-NO ₃).....	44
Amonio (N-NH ₄)	44
Supervivencia de los mejillones al cabo de la experiencia.....	45
Cuantificación e identificación de grupos de bacterias presentes en el biofilm de <i>Limnoperna fortunei</i>	45
Composición de bacterias al inicio de la experiencia.....	46
Composición de las bacterias al tiempo final	47
Análisis de Componentes principales	52
DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	65

RESUMEN

El estudio de los factores de cambio ambiental introducidos por las actividades humanas es importante para comprender las dinámicas de los ecosistemas. En esta tesis estudiamos dos factores de cambio de origen antropogénico: el mejillón dorado *Limnoperna fortunei* y el herbicida glifosato, enfocándonos en los efectos que tiene el mejillón sobre la concentración de glifosato en los ecosistemas de agua dulce y el comportamiento que tienen los grupos bacterianos asociados al biofilm de las valvas del mejillón ante la presencia de este herbicida.

Para analizar el efecto del glifosato, del molusco y su interacción sobre la abundancia y composición bacteriana del biofilm asociado a las valvas del mejillón dorado, se llevaron a cabo bioensayos semi estáticos bajo condiciones controladas de laboratorio y se midieron los cambios en la concentración de nutrientes y glifosato en presencia y ausencia del mejillón. Los grupos bacterianos presentes en el biofilm de las valvas de los moluscos y sus modificaciones ante la presencia del glifosato, se analizaron mediante la técnica de biología molecular CARD FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *in situ* Hybridization).

La significativa reducción de la concentración del glifosato en presencia de *Limnoperna fortunei* y de sus valvas, conjuntamente con el aumento significativo en la concentración de ácido aminometilfosfónico (AMPA), principal metabolito en la degradación de glifosato, al igual que el aumento significativo en la concentración de fosfatos, nitratos y amonio, sugieren la intervención de *Limnoperna fortunei* y de las bacterias presentes en el biofilm de sus valvas en la degradación de este herbicida. Los resultados obtenidos también sugieren que en la reducción del herbicida pueden estar actuando otros mecanismos asociados al metabolismo propio de *Limnoperna fortunei* o a las bacterias presentes en su cavidad paleal y/o del tracto digestivo del molusco.

Se analizaron 5 grupos bacterianos dentro de las Eubacterias, propios de ecosistemas de agua dulce (alfaproteobacterias, betaproteobacterias,

gamaproteobacterias, actinobacterias, bacteroidetes) y se encontró un aumento significativo del grupo gamaproteobacterias ante la presencia de glifosato, lo que estaría indicando la participación de este grupo en la degradación de glifosato en el agua.

Este estudio constituye un punto de partida para el estudio del componente bacteriano del biofilm presente en las valvas de *Limnoperna fortunei* y abre la posibilidad de pensar en este invasor como un aliado en la biodegradación del glifosato, sin embargo tanto la presencia de *Limnoperna fortunei* como la del glifosato y su interacción parecen acelerar los procesos de eutrofización en los ecosistemas de agua dulce.

SUMMARY

The study of environmental change stressors introduced by human activity is important to understand the dynamics of ecosystems. In this thesis we assessed two stressors of anthropogenic origin: the golden mussel *Limnoperna fortunei* and the herbicide glyphosate, focusing in the effect of the mussel over glyphosate concentration in freshwater ecosystems, and the response of the bacterial groups of the biofilm attached to valvae in the presence this herbicide.

Laboratory semi-static bioassays under controlled conditions were carried out in order to analyze the effect of glyphosate, of the mussel and of their interaction on valvae's biofilm bacterial abundance and composition. Variations in nutrients and glyphosate concentrations were evaluated in the presence and absence of the mussel. The bacterial groups present in the valvae biofilm and their variations in presence of glyphosate, were analyzed with the catalyzed reported deposition-fluorescence *in situ* hybridization (CARD-FISH).

The significant reduction in glyphosate concentration in the presence of *L. fortunei* (either alive or empty valvae), jointly with the significant increase in the aminomethylphosphonic acid (AMPA) concentration, the main breakdown product of glyphosate, as the significant increase in phosphates, nitrates and ammonia concentrations, suggest that *L. fortunei* and bacteria in the valvae's biofilm are involved in the herbicide degradation. These results also suggest that there might be other mechanisms associated to the metabolism of the mussel or bacteria present in the mussel mantle cavity and/or in its digestive tract.

Six bacterial groups typical in freshwaters (*Eubacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*) were analyzed, and there was a significant increase in *Gammaproteobacterias* in the presence of glyphosate, which could indicate that this group plays a role in glyphosate degradation in water.

Our study is a first step in the assessment of the bacterial biofilm present in *Limnoperna fortunei* valvae, and lets us think about the possibility of this invader

as a biological agent in glyphosate biodegradation. However, both the presence of *L. fortunei* or glyphosate, and also their interaction, seem to accelerate eutrophication processes in freshwater ecosystems.

AGRADECIMIENTOS

“El primer territorio que se habita es el vínculo”

Gustavo Wansidler

Realizar esta tesis no fue fácil, pero fue un lindo camino de aprendizaje en el que me vi acompañada y alentada por muchas personas sin las cuales no podría haber llegado a feliz puerto, como dice Daniel.

Daniel gracias por tu conocimiento, por tu experiencia, por tu rigor científico. Gracias por tu comprensión en los momentos difíciles y por animarme en cada paso. Tu corazón bondadoso y tu exigencia me permitieron crecer mucho y esperar cada resultado, con la entera convicción que habíamos hecho todo con excelencia. Más que un director fuiste un maestro de vida, gracias por tantos aprendizajes.

Irina, gracias por abrirme las puertas a este lindo grupo de investigación donde conocí gente tan maravillosa. Desde el primer día me recibiste con una sonrisa y con toda la disponibilidad para poder realizar este trabajo. Gracias por todos tus aportes, por tu conocimiento y tu dirección en esta tesis, por revisarme con dedicación cada palabra y permitirme aprender tanto.

Juan Saad, compañero de CARD-FISH, gracias infinitas por lanzarte conmigo a esta técnica que para decir verdad, sabemos es complicadita. Gracias por tu confianza y por animarme siempre. Estoy segura que sin tu buena onda, tus mates y tu positivismo no nos habría salido tan bien.

Haydée gracias porque siempre estuviste ahí con la disponibilidad para ayudarme, me facilitaste bibliografía y tus canciones de folklore bien entonadas me animaron muchas veces mientras contaba bacterias en el cuarto oscuro.

Gracias Inés O’Farrell por tu ternura para conmigo, por tu sonrisa y por darme ánimo en los momentos difíciles que fueron muchos.

A todos mis amigos compañeros y compañeras del laboratorio de Limno: Juan, Lilen, Laura, Sole, Solange, Eugenia, Romina, Paula, Rubén, Alicia, Patri, Dr Rodri, Luz, Vero, Carmen, Sol, Martín y Maru por toda su buena onda, sus mates, su calidez, por recibirme siempre con una sonrisa, por hacerme sentir como en casa. Gracias por toda la bibliografía suministrada y por su ayuda en el laboratorio a todos y de tantas maneras.

Martin Graziano, gracias por tu colaboración en la determinación de glifosato y por las buenas noticias que fueron estos resultados y los del AMPA.

Gracias a Esteban y a mis compañeras de hidrobiología del museo y de la UBA: Silvia, Aurora, Romina, Daniela, Violeta y Flor que siempre me ayudaron a cuidar el experimento de *Limnoperna fortunei* y glifosato y me dieron ánimo en cada paso.

A mis profesores y compañeros de maestría, en especial a Andrea y Diana que con su amistad me fortalecieron y animaron siempre.

A Hans mi compañero de vida. Mi amor gracias porque siempre has creído en mí, porque todos los días me acompañas, porque trabajaste duro para que yo pudiera hacer la tesis, porque tu amor me sostiene en cada paso y tus abrazos me han contenido en los momentos difíciles. Gracias por soñar y hacer posible lo imposible. Este logro es de ambos, sin duda.

A mi familia en Colombia que siempre han creído en mí y se han sentido orgullosos, por el ánimo que me dan constantemente. Gracias a mi padre chuchito y mi madre Elvita por todo su amor, por sus lecciones de vida, porque me esperan sin cansarse y me acompañan con sus oraciones para lograr esta meta. Gracias tío Arturo por todo tu cariño, por tantos aprendizajes y porque eres otro padre para mí, gracias a mi ninita que desde el cielo y la dimensión del amor siempre me sigue acompañando. A mis hermanos tan altruistas y sus familias: Javier, Edwin, Tita y Negrito por alentarme siempre a seguir y por cuidar de mis padres siempre. A mis sobrinos y sobrinas: Paulita con Samuelito incluido, Mayra (mi reina), Andrea, Sergio, José David, Santiago, Sofía porque son mi alegría y un gran motivo para estudiar y salir adelante.

Los amigos son la otra familia que nos elegimos. Gracias a todos mis amigos, los de aquí y los de allá, por su compañía siempre, por su aguante y su fortaleza, por los cafés y mates compartidos. Imposible nombrarlos a todos. Gracias a Sandra Mansilla por recibirnos en Buenos Aires y en su casa, porque siempre hemos podido contar contigo y a los amigos y amigas de “La Territorios” porque en nombre de los argentinos han hecho de este país nuestra tierra. Gracias a Teresa mi gatica por su compañía.

Gracias a los fondos que financiaron esta tesis: UBACyT 20020130100248BA y PICT Bicentenario 2010-0908 y al Consejo Mundial de Iglesias que por su apoyo económico me permitió venir a estudiar a Argentina.

Gracias a mi tierra y la Vida manifestada en Málaga-Santander que con sus altas montañas forjó en mí valentía, perseverancia y este corazón fuerte para asumir los desafíos.

A mi padre, luchador incansable

INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas y sus diversas interacciones con la naturaleza han afectado los ecosistemas modificándolos y provocando la contaminación y la degradación del ambiente natural (Matthaei *et al.*, 2010). Fruto de estas actividades, se han transportado organismos a veces de forma accidental y también se han introducido al ambiente gran cantidad de productos químicos, xenobióticos y otros agentes de origen antropogénico, que al ser altamente contaminantes pueden llegar a generar cambios en los ecosistemas afectando el equilibrio del suelo, el agua y la atmósfera. Dichos factores, presentes en los ambientes, pueden interactuar entre sí, desencadenando en los ecosistemas procesos que tienen consecuencias muchas veces impredecibles. Estudiar este tipo de interacciones es importante para comprender las dinámicas de los componentes de los ecosistemas y su comportamiento frente a estos factores externos derivados de las actividades humanas.

Entre los factores de cambio introducidos, los fertilizantes y agrotóxicos ocupan un lugar importante ya que dentro del modelo productivo agroindustrial a gran escala, son utilizados en grandes cantidades afectando la calidad del agua, del suelo y de la atmósfera.

El glifosato, es uno de los agrotóxicos de mayor uso a nivel mundial (Liphadzi *et al.*, 2005) y existe en la actualidad un importante debate en el ámbito académico en relación a los efectos que ejerce sobre los ecosistemas, la salud humana, la calidad de los cuerpos de agua y los organismos en general.

Este herbicida es empleado en el modelo productivo agroindustrial con variedades de plantas resistentes (Annett *et al.*, 2014), en el cual grandes superficies de tierra son destinadas a monocultivos y se hace un uso generalizado de productos químicos buscando un mayor rendimiento y beneficios de tipo económico, con un impacto innegable sobre la agricultura, los ciclos biológicos y el equilibrio de los ecosistemas (Gilbert, 2013). Los

cuerpos de agua son ecosistemas muy susceptibles a estos agentes de cambio y por lo tanto se han visto fuertemente afectados por el avance de este modelo agrícola intensivo.

Por su parte, el mejillón dorado *Limnoperna fortunei* fue introducido en el estuario del Río de la Plata presumiblemente por el transporte realizado en buques de ultramar procedentes del Asia en los años 90. (Pastorino *et al.*, 1993). Si bien la distribución de las especies cambia naturalmente a lo largo del tiempo, la actividad del ser humano ha generado corredores de invasión como rutas acuáticas, terrestres o aéreas que incrementan en gran medida la tasa y escala espacial de estas distribuciones (Ricciardi y MacIsaac, 2000). Como consecuencia de ello la biodiversidad de los ecosistemas puede verse afectada y en especial la de los ecosistemas de agua dulce que se han visto modificados más rápidamente que los ecosistemas terrestres y marinos (Bampfylde *et al.*, 2010; Ricciardi y MacIsaac, 2011).

Una de las consecuencias indeseables del transporte de mercaderías que se realiza entre los países a escala global a través de buques de ultramar, que utilizan el agua de lastre, es el incremento en el número de organismos exóticos en los ecosistemas. Los tanques de lastre son llenados en el puerto de origen con el agua circundante conteniendo diferentes organismos tales como larvas y microorganismos, que luego son liberados con el agua en el puerto de destino. Aunque algunos de estos organismos mueren, otros pueden llegar a sobrevivir y colonizar con éxito nuevos ambientes, convirtiéndose a veces en verdaderas plagas, desplazando especies nativas o causando problemas económicos y/o sanitarios. Se estima que aproximadamente 4 millones de toneladas de agua de lastre son transferidas globalmente cada año y que 7000 especies de bacterias, plantas y animales son cargadas cada día en el agua de lastre de buques alrededor del mundo (Darrigran y Damborenea, 2006b). En ella se pueden transportar también animales invasores que causan problemas ambientales y económicos, como fue el caso del mejillón cebra *Dreissena polymorpha* el cual invadió norte América en los años 80, afectando las interacciones en las cadenas tróficas, la mineralización de nutrientes, la

disponibilidad de oxígeno, las tasas de sedimentación y las dinámicas de contaminación (Karatayev *et al.*, 1997; 2007a; Strayer *et al.*, 1999).

El estuario del Río de la Plata, es una importante vía marítima/fluvial, en donde se localiza el puerto de Buenos Aires (Argentina) y el puerto de Montevideo en Uruguay, los cuales son utilizados en forma intensiva para el transporte de productos entre diferentes lugares del mundo. Como se detalla a continuación, debido a las actividades de transporte en este puerto, en la década de los 90 fue introducido a la cuenca del Río de la Plata el mejillón dorado *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857), causando problemas ambientales en toda la región.

***Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)**

Características y expansión

El mejillón dorado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), es nativo de los ríos del sudeste de Asia, incluyendo China, Tailandia, Corea, Laos, Camboya, Vietnam e Indonesia. En 1965 llegó a Hong Kong y entre 1980 y 1990 se extendió a Taiwán y Japón. (Ricciardi y Rasmussen, 1998); se cree que en la Argentina fue introducido hacia el año 1991 en la desembocadura del Río de la Plata por medio del agua de lastre de los buques de ultramar provenientes del continente asiático (Pastorino *et al.*, 1993).

Desde su ingreso al Río de la Plata, se ha establecido con gran éxito debido a rápido crecimiento, su maduración temprana, su elevada tasa de fecundidad y su adaptabilidad al ambiente (Darrigran y Damborenea, 2006a; Pastorino *et al.*, 1993; Darrigran y Pastorino, 1993; Darrigran y Ezcurra de Drago, 2000a), así como por sus larvas de vida libre que han facilitado su dispersión y el aumento de su población (Cataldo *et al.*, 2005a).

Si bien su densidad es variable, se ha constituido en la especie dominante de la fauna bentónica de prácticamente todo el sistema del Paraná-

Río de la Plata, alcanzando colonias de densidades de más de 200.000 individuos/m² (Figura 1) (Boltovskoy *et al.*, 2006; Boltovskoy, 2015). La densidad de sus larvas plantónicas en el embalse del Río Tercero, ha sido estimada en 4168 ind/ L (959 ind/m²) (Boltovskoy *et al.*, 2009 a) y en 6000 a 7000 larvas/m³ en el Río Paraná y el Río de la Plata (Boltovskoy *et al.*, 2009b; Cataldo y Boltovskoy, 2000).



Figura 1. Colonias de *Limnoperna fortunei* en el Embalse Río tercero Córdoba.
Fuente: Cataldo (2015). Comunicación personal

Limnoperna fortunei tiene preferencia por colonizar sustratos duros y sus mayores densidades se ubican en superficies inmóviles como muelles, diques rectos, espigones, rompeolas, pilotes, revestimientos, armaduras, gaviones, muros de muelle, cascos de los barcos y otros (Correa *et al.*, 2015). Sin embargo, en el delta se le ha encontrado en raíces y restos de vegetales fibrosos (Boltovskoy *et al.*, 2006).

El mejillón dorado ha continuado desplazándose hacia el norte, avanzando a contracorriente a una velocidad de 240 km/año (Darrigran y Ezcurra de Drago, 2000a,b) principalmente adherido a los cascos de los barcos y también a objetos propios de las embarcaciones y otros elementos

relacionados con la pesca que se transportan por tierra (Figura 2) (Darrigran y Dreher, 2006).



Figura 2. Colonización del mejillón dorado sobre distintas partes de las embarcaciones. Timón, corredera, toma de agua del sistema de refrigeración del motor.

Fuente: Cataldo (2015). Comunicación personal

Su primer registro en Argentina fue en la playa Bagliardi a 20 km de la ciudad de la Plata en el estuario del Río de la Plata en 1991. (Pastorino *et al.*, 1993). A principios de 1994 *Limnoperna fortunei*, ocasionó el primer caso conocido de “*macrofouling*” para agua dulce de América del Sur registrado en una planta potabilizadora de agua en la ciudad de la Plata y después se dieron otros casos en la Ciudad de Buenos Aires. (Darrigran, 1995). El *macrofouling* consiste en el taponamiento de estructuras por altas densidades de organismos,

A partir del año 1995 el mejillón dorado superó los límites del Río de la Plata, ingresando al Río Paraná (Villar *et al.*, 1997a), al Río Santa Lucía en Uruguay en 1996 (Brugnoli *et al.*, 2005), a Paraguay ingresó en el año 1997 y a Misiones en ese mismo año (Darrigran y Ezcurra de Drago, 2000a). En el 2001 fue encontrado en la represa de Itaipú en Brasil (Zanella y Marena, 2002) y ese mismo año fue encontrado en Nueva Palmira- Uruguay y en el

2002 a lo largo de la costa del estuario del Río de la Plata en la ciudad de Montevideo (Brugnoli *et al.*, 2005). Por otra parte aunque la distribución en Bolivia no se conoce bien, aparentemente aún no ha colonizado el Río Pilcomayo y el Río Bermejo ni el Río Salado que desemboca en el Paraná (Darrigran *et al.*, 2011).

En un periodo de 7 años, *Limnoperna fortunei* se extendió 1200 km aguas arriba del Río Paraguay (Oliveira *et al.*, 2011). Se ha dispersado sobre el sistema Guaíba-Patos a lo largo del sur de Brasil y la costa uruguaya, complejo que incluye los lagos Guaíba, Patos, Mirim y Mangueira y en el cual descargan sus aguas los ríos Jacuí y Sinos. El mejillón dorado también se ha dispersado por el sistema del Río Tramandaí en el año 2008 y 2009 (Fagundes de Freitas *et al.*, 2009) y en enero de 2013 se detectó su presencia en los lagos Itapeva y en el canal entre los lagos Quadros e Itapeva (Mansur *et al.*, 2014). Para el 2014 se encontró en el norte de Pantanal, Brasil.

Así avanzando por la cuenca del Río de la Plata esta especie invasora subió a la zona del Paraná, Sao Paulo, y Minas Gerais Brasil y actualmente se encuentra presente no solo en Argentina sino en Uruguay, Paraguay, Brasil y Bolivia (Boltovskoy *et al.*, 2006) (Figura 3) y se prevé que en el futuro el mejillón dorado puede continuar avanzando hacia la cuenca del Río Amazonas, América Central, América del Norte y otras partes del mundo (Morton, 1975; Ricciardi, 1998a; Boltovskoy *et al.*, 2006; Karatayev *et al.*, 2007b; Oliveira *et al.*, 2010).



Figura 3: Distribución de *Limnoperna fortunei*.
Fuente: Cataldo D. 2015. Comunicación personal

Su futura dispersión se ha podido predecir mediante modelos ecológicos como el GARP (Genetic Algorithm for Rule-set Prediction) que tienen en cuenta factores ambientales como la relación disturbios/recursos, las propias características de la especie invasora, la ocurrencia de las especies en cuanto a latitud y longitud y el cambio climático y se prevé que en el futuro el mejillón dorado puede continuar colonizando los ambientes dulceacuícolas en todo el mundo.

Ciclo de vida

El mejillón dorado es una especie dioica con un bajo porcentaje de hermafroditismo. Su período reproductivo se extiende aproximadamente 9 meses al año alternando con un descanso reproductivo de 3 meses durante los meses más fríos del año (Boltovskoy y Cataldo, 1999; Cataldo y Boltovskoy, 2000). El ciclo de vida de *Limnoperna fortunei* inicia con la liberación de las gametas de ambos sexos al agua. Luego de la fecundación se desarrollan distintos estadios larvales, que incluyen la larva trocófora, larva velígera, larva plantígrada y dependiendo de la temperatura del agua están listos para fijarse a un sustrato entre los 11 y 20 días después de la fecundación (Cataldo, 2015) (Figura 4).

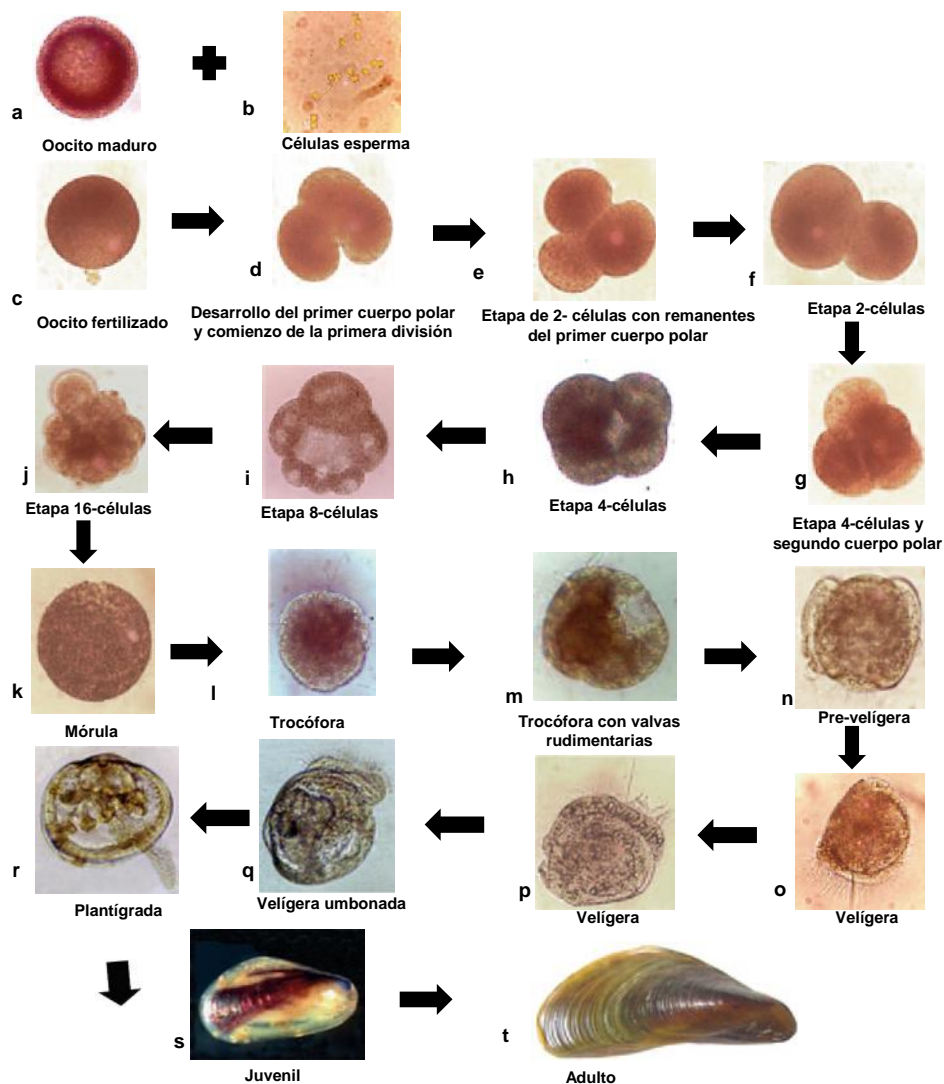


Figura 4. Etapas larvales de *Limnoperna fortunei*. (Cataldo, 2015)

El desarrollo de estas series de larvas planctónicas contribuye a su éxito para conquistar nuevos ambientes, en especial su estado de larva velígera que ha facilitado su dispersión. El pequeño tamaño de sus larvas planctónicas (100-300 μm) (Cataldo, 2015), le permite avanzar también a través de los filtros y redes de protección de las instalaciones y plantas industriales y esto ha llevado al asentamiento y desarrollo de los organismos adultos, los cuales al instalarse ocasionan problemas de taponamiento de estas estructuras. (Cataldo, 2015). (Figura 5).

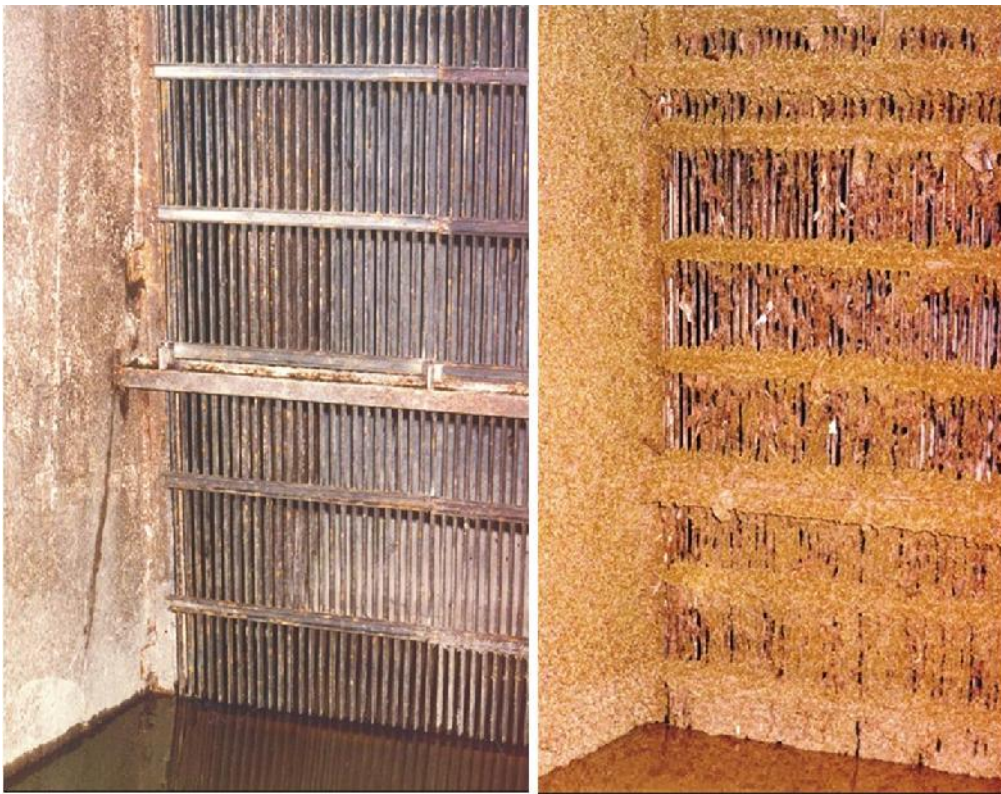


Figura 5. Rejas de la toma de agua de la central Nuclear Atucha I- Río Paraná de las Palmas.

Fuente: Cataldo D. 2015. Comunicación personal

El tiempo de vida estimado de *Limnoperna fortunei* en Argentina, fue calculado entre 3 y 4 años en una planta nuclear en el río Paraná inferior (Boltovskoy y Cataldo, 1999), aunque hay reportes en China central, de tiempos de vida comprendidos entre 2 y 10 años y en Corea de 4 a 5 años. (Iwasaki y Uryu, 1998) Estas variaciones del tiempo de vida estimado se pueden deber a diversos factores ambientales, tales como la temperatura, la

producción primaria o la abundancia del material orgánico suspendido en el agua (Darrigan y Damborenea, 2006a).

Limnoperna fortunei es un organismo filtrador que se alimenta de las partículas suspendidas en el agua. Debido a la baja disponibilidad de nutrientes en los ríos, se requiere la filtración de grandes cantidades de agua por los mejillones para suplir sus necesidades energéticas y si su densidad poblacional es alta, repercute en la columna de agua, disminuyendo su turbidez y aumentando las concentraciones de nutrientes en el fondo lo que permite el crecimiento de vegetación fanerógama sumergida (Cataldo *et al.*, 2005b).

La tasa de filtración en *Limnoperna fortunei* varía en función de varios factores como son la temperatura del agua y la talla de los animales. Se sabe que los juveniles tienen mayor demanda metabólica y que la relación superficie de las branquias versus tamaño disminuye con la edad (Kryger y Riisgård, 1988; Reeders y Bij de Vaate, 1990).

Estudios experimentales indican que *Limnoperna fortunei* en 24 horas es capaz de remover el 84% de nitrógeno particulado y 49% de fósforo particulado presente en el agua, generando una producción de amonio de $3\mu\text{M NH}_3\text{g PS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y una producción de fosfatos que $0,42 \mu\text{M PO}_4 \text{ g PS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. (Cataldo *et al.*, 2012a). Su tasa de filtración está estimada en $1,48\text{-}3,14 \text{ mL mg PS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, lo que significa que alcanza valores de $100 \text{ mL ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Cataldo *et al.*, 2012a). Con estos datos se puede decir que para un cuerpo de agua como la Reserva de Rio Tercero, en la cual la densidad media de *L. fortunei* fue calculada en 959 ind m^{-2} (Boltovskoy *et al.*, 2009) y teniendo una tasa de filtración de $1.6 \text{ mL PS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, teóricamente el volumen de agua de la reserva podría ser filtrado por los mejillones entre 7 y 8 días. (Cataldo *et al.*, 2012a).

Impacto en el ecosistema

La elevada tasa de filtración de esta especie sin duda ejerce un impacto negativo en la estructura y la función del ecosistema (Boltovskoy *et al.*, 2009;

Cataldo *et al.*, 2012b; Sylvester *et al.*, 2005). Existen semejanzas funcionales entre los mejillones invasores *L. fortunei* y *Dreissena* sp (el cual ha ocasionado serios problemas en América del Norte), en cuanto a sus efectos sobre el reciclado de nutrientes (Karatayev *et al.*, 1997; Boltovskoy *et al.*, 2006; Ward y Ricciardi, 2007; Kelly *et al.*, 2010; Burlakova *et al.*, 2012). El mejillón dorado ejerce un control por pastoreo del seston, modifica la proporción y la disponibilidad de nutrientes y produce cambios en las propiedades de la columna de agua tales como la transparencia y la materia suspendida. (Boltovskoy *et al.*, 2009, Cataldo *et al.*, 2012b). En estudios realizados en la represa de Salto Grande y en el embalse Río Tercero (Córdoba), se vio que los niveles de amonio, nitrato y fosfato aumentan fuertemente en presencia del mejillón dorado (Cataldo *et al.*, 2012a,b) y que de igual manera, la filtración realizada por el mejillón, disminuye la turbidez y las concentraciones de carbono orgánico particulado en agua (Kawase, 2011).

De la misma manera, las heces y pseudoheces que produce el mejillón tienden a disminuir la disponibilidad de oxígeno disuelto (Correa *et al.*, 2015) y al ser depositadas en el fondo contribuyen al aumento de las abundancias de invertebrados bentónicos (Sylvester *et al.*, 2007; Sardiña *et al.*, 2008). Ello determina que este material orgánico que antes pasaba rápidamente por el sistema y terminaba fertilizando las aguas costeras oceánicas, sea retenido en las aguas dulces por períodos de tiempo variables, potenciando las relaciones tróficas y la producción locales.

Por su parte, desde su introducción en el Río de la Plata, el mejillón dorado ha mostrado fuertes interacciones tróficas directas con algunos componentes de la biota local (Darrigran *et al.*, 1998, Darrigran, 2002; Darrigran y Damborenea, 2006a; García y Montalto., 2006; Paolucci *et al.*, 2007; Sylvester *et al.*, 2007; Sardiña *et al.*, 2008; Cataldo, 2015), ocasionando cambios en las poblaciones de fanerógamas acuáticas (Cataldo *et al.*, 2012a), zoobentos (Sardiña *et al.*, 2008), plancton (Sylvester *et al.*, 2005; Pestana *et al.*, 2009; Rojas Molina *et al.*, 2010; 2011; Cataldo *et al.*, 2012 a) y disminución de la concentración de fitoplancton pero no en su composición o el tamaño de sus células (Cataldo *et al.*, 2012a). También tiene incidencia en las relaciones

con peces (Montalto *et al.*, 1999; Penchaszadeh *et al.*, 2000; Cataldo *et al.*, 2002; García y Montalto, 2006; Paolucci *et al.*, 2007; 2010a,b; Cataldo, 2015) para los cuales *L. fortunei* constituye una fuente de alimento importante (Karatayev *et al.*, 2002; Strayer *et al.*, 2004; Cataldo, 2007a; 2015; Boltovskoy y Correa, 2015). De igual forma se sabe que puede tener un impacto sobre las poblaciones de animales planctónicos como rotíferos y microcrustáceos (Rojas Molina y José de Paggi, 2008; Rojas Molina *et al.*, 2011; 2012) y producir homogenización de composición de fauna en los ambientes (Sardiña *et al.*, 2011). Además, se cree que el mejillón dorado puede tener algunos otros efectos como la biomagnificación y transferencia de contaminantes (Villar *et al.*, 1997b) y cambios térmicos debidos a las variaciones en la disponibilidad de la luz (Yu y Culver, 2000).

Por otro lado, este molusco favorece la agregación de colonias de cianobacterias como *Microcystis* (Cataldo *et al.*, 2012b; Boltovskoy *et al.*, 2013).

Limnoperna fortunei ha ocasionado problemas de macrofouling en represas hidroeléctricas (Cataldo *et al.*, 2005b; Palomino Cuya *et al.*, 2013), como es el caso de Itaipú y Yacyretá en el río Paraná, Salto Grande en el río Uruguay y en el Embalse Río Tercero (Córdoba). Además la mayoría de las industrias que utilizan agua de los ecosistemas dulceacuícolas colonizados por el mejillón tienen problemas, incluidas las instalaciones de tratamiento de agua, plantas de energía nuclear y centrales térmicas, refinerías, fábricas, plantas de procesamiento de alimentos y otras (Oliveira *et al.*, 2015).

En estudios recientes realizados por Di Fiori *et al.* (2012), se pudo comprobar que *Limnoperna fortunei* en condiciones experimentales, favorece la mineralización del herbicida glifosato en agua, disminuyendo su concentración. Como se mencionó anteriormente, este agrotóxico es de amplio uso en la producción agrícola de Argentina y de la región suramericana y su uso continúa aumentando en el actual modelo productivo agroindustrial a gran escala.

Glifosato

El glifosato (N-fosfonometilglicina, $C_3H_8NO_5P$, CAS 1071-83-6), es un herbicida no selectivo que se usa en plantas perennes y anuales (Barja y dos Santos Afonso, 1998). Actúa penetrando en las hojas y en otras partes de la planta inhibiendo la enzima 5'-enolpiruvil shiquimato-3'-fosfato sintetasa, la cual es esencial para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, vitales para las plantas como son la fenilalanina, tirosina y triptófano. (Salisbury y Ross, 1994; Williams *et al.*, 2000). Al inhibirse esta enzima y no producirse estos aminoácidos, se reducen la síntesis de proteínas lo que se traduce en disminución del crecimiento y muerte prematura de la planta (Lydon y Duke, 1988). (Figura 6).

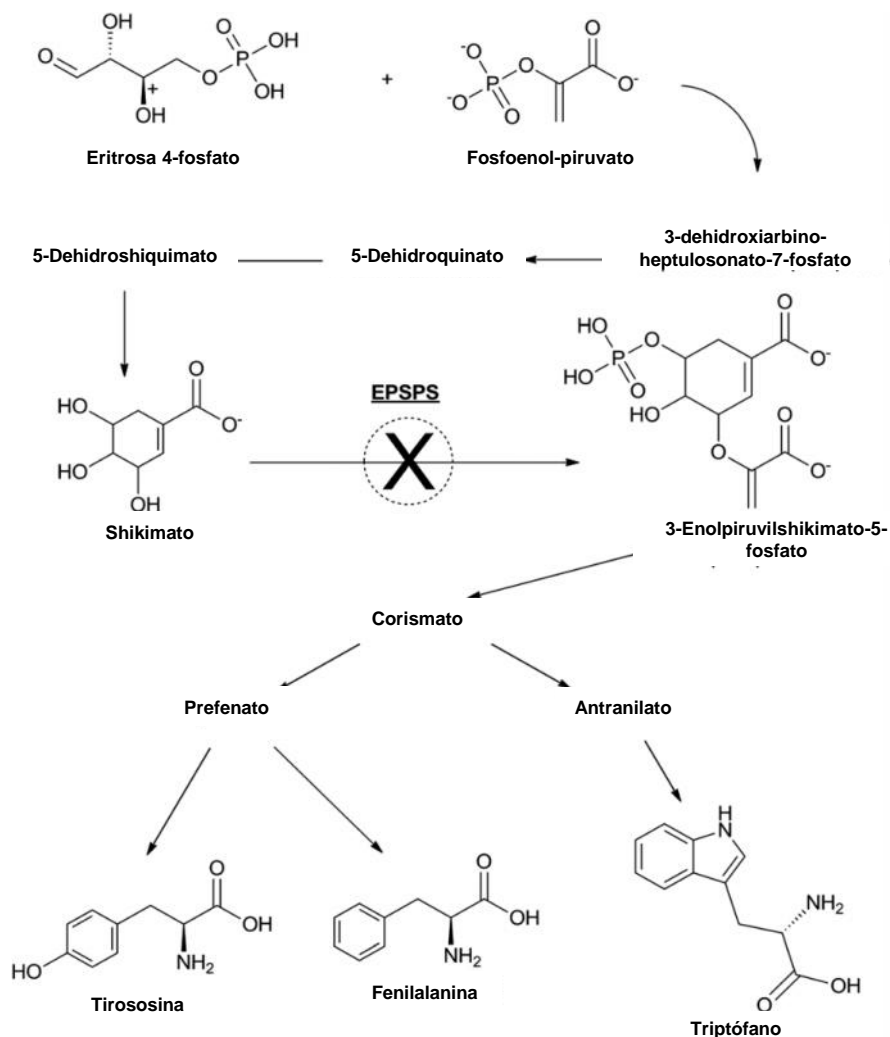


Figura 6. Mecanismo de acción del glifosato en plantas.

Fuente: Annet *et al.* (2014).

La solubilidad en agua del glifosato es 10,000–15,700 mg l⁻¹ a 25 °C, con lo cual es claro que se dispersa y se disuelve en ecosistemas acuáticos (Mackay *et al.*, 1997) y la solubilidad y movilidad de los metabolitos del glifosato son variables; por ejemplo el Ácido aminometilfosfónico (AMPA), principal metabolito de su proceso de degradación, muestra una movilidad en suelo significativamente más alta que el glifosato puro. (Kjaer *et al.*, 2005). El factor ambiental que más afecta la toxicidad del glifosato es el pH, siendo más tóxico en medios alcalinos (Annett *et al.*, 2014). Por su parte, la toxicidad de los componentes de los formulados a base de glifosato han sido estudiados y se ha demostrado que los aditivos surfactantes son usualmente más tóxicos que el glifosato puro (Giesy *et al.*, 2000).

Como ya se mencionó, el glifosato es uno de los agrotóxicos de mayor uso a nivel mundial (Liphadzi *et al.*, 2005). En el año 2011 se aplicaron 650 millones de toneladas en los campos de todo el mundo (CCM International, 2011) y en Argentina durante el 2012 se aplicaron 197 millones de litros de este herbicida (CASAFE, 2013). Considerando el 100% de herbicidas utilizados en Argentina en el cultivo de soja, el 76% corresponden a glifosato. (Figura 7.)

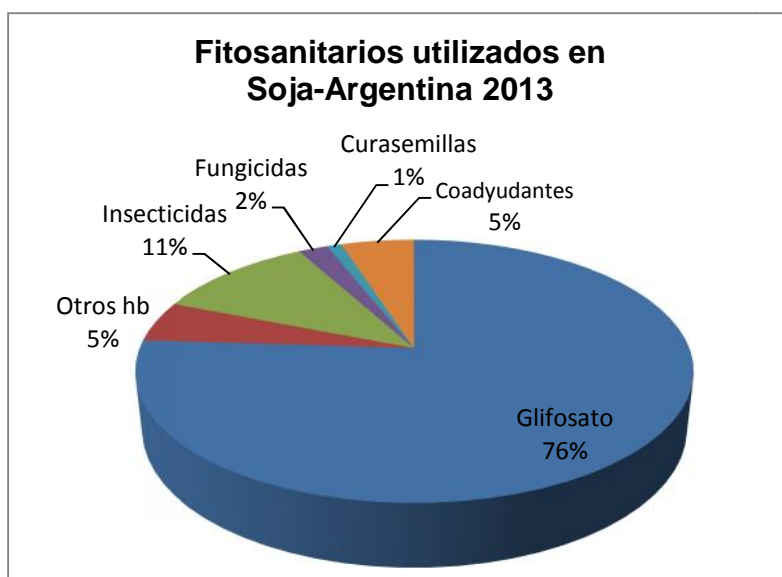


Figura 7. Fitosanitarios utilizados en Soja en Argentina- 2013.
Fuente: Datos Kleffmann Group /2013 Pampas Group Argentina

El glifosato se emplea en Argentina principalmente en el cultivo de soja el cual a partir de los años 90 tuvo un gran aumento alcanzando 19.792.100

hectáreas sembradas en la última campaña de 2014-2015 (SIIA, 2015) (Figura 8). Este cultivo se produce mediante un paquete tecnológico de siembra directa con semillas genéticamente modificadas resistentes a glifosato (INTA, 2015). El glifosato también se emplea en el país en otros cultivos como maíz y algodón al igual que en prácticas agrícolas como el barbecho químico.

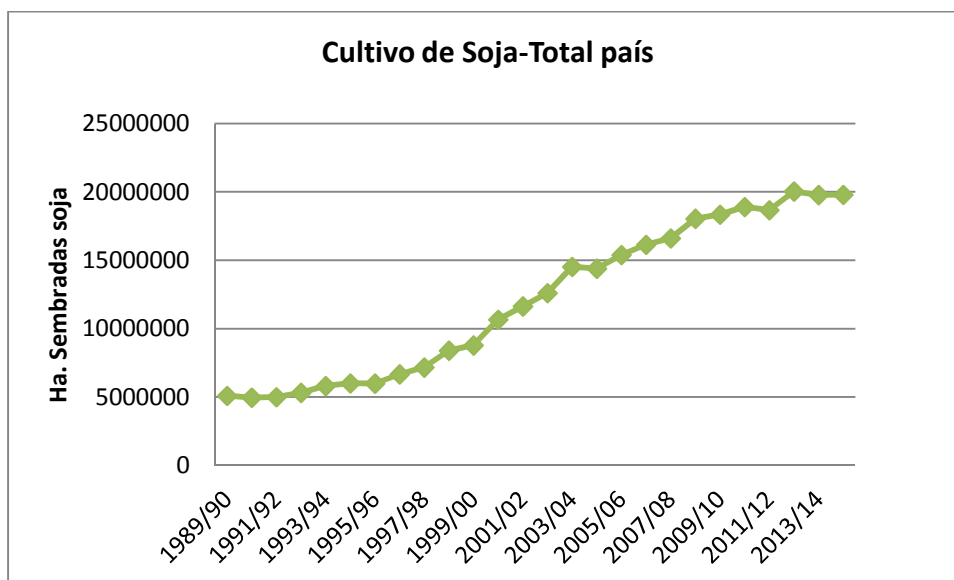


Figura 8. Superficie de tierra sembrada con soja.

Fuente Datos: Ministerio de agricultura, ganadería y pesca. Argentina

Glifosato en los cuerpos de agua

En la Argentina, la actividad agropecuaria se encuentra fuertemente ligada a la disponibilidad de agua, lo cual resulta en una relación directa entre la localización de los campos cultivados y los ecosistemas acuáticos superficiales y subterráneos (INTA, 2015). Por esto el glifosato puede alcanzar los cuerpos de agua por medio de la deriva accidental o impulsado por el viento cuando se hace aspersion aérea con aeroplanos o pulverizadores autopropulsados sobre los campos sembrados, al igual que por procesos de lixiviación, deriva y escorrentía superficial (Feng *et al.*, 1990; Borggaard y Gimsing, 2008; INTA, 2015). Figura 9.

Al entrar al cuerpo de agua el glifosato contamina y disminuye la calidad del agua (Pérez *et al.*, 2007), aumentando la exposición de los organismos acuáticos al herbicida (Annett *et al.*, 2014) y desencadenando procesos de eutrofización en el ecosistema, debidos principalmente a los nutrientes que quedan disponibles después de su degradación, principalmente el fósforo (Pérez *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2010).

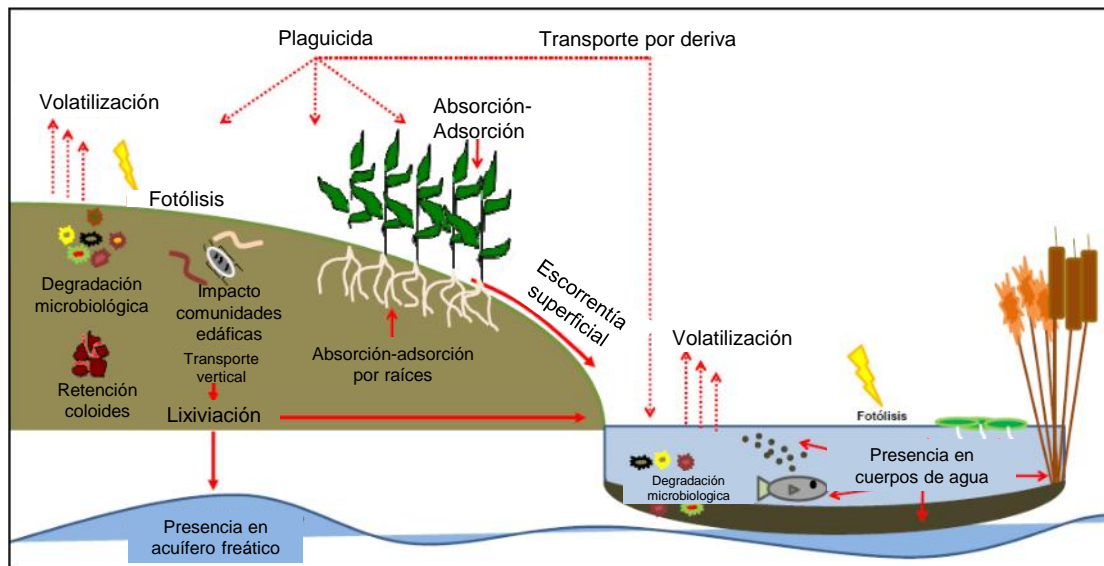


Figura 9. Destino de un plaguicida en el ambiente.
Fuente: INTA. 2015

Los efectos del glifosato en los cuerpos de agua incluyen cambios en las estructuras de las comunidades microbianas (Pérez *et al.*, 2007; Relyea, 2005a) tales como aumento en la abundancia de picocianobacterias en cuerpos de agua eutróficos y oligotróficos (Pizarro *et al.*, 2015 a) y también puede tener un potencial negativo sobre organismos filtradores tales como crustáceos y moluscos, organismos del sedimento y sobre peces y anfibios. (Folmar *et al.*, 1979; Liong *et al.*, 1988; Relyea *et al.*, 2005; Relyea, 2005b).

El promedio de vida media del glifosato en los cuerpos de agua dulce puede ser mayor a 60 días (Bonnet *et al.*, 2007); los peores escenarios de concentración de glifosato predichos en superficie están comprendidos entre 1700 y 5200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Giesy *et al.*, 2000; Glozier *et al.*, 2012) y podrían presentarse en incidentes de derrames accidentales o por la aplicación directa

a los cuerpos de agua, al igual que en los lugares donde se lavan los recipientes y equipos de fumigación (Carter, 2000).

En estudios realizados en cursos de agua del norte de Buenos Aires (sub-cuenca del Arroyo Arrecife), se detectó AMPA y concentraciones de glifosato de 100-700 $\mu\text{g L}^{-1}$ en agua superficial y entre 500-5000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ en suelos y sedimentos (Peruzzo *et al.*, 2008). En la provincia de Misiones en el norte Argentino se hizo un estudio en el que se midió glifosato en 27 ríos y arroyos que proveen agua a la región, encontrándose que en todos los sitios la concentración fue inferior a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, excepto en el Río San Antonio en el cual se detectó glifosato a una concentración de 1600 $\mu\text{g L}^{-1}$, ubicándose ésta muy cerca del rango de peor escenario de concentración por glifosato. (Avigliano y Schenone, 2015).

Por otro lado, estudios de sedimentos de fondo de 44 arroyos de la provincia de Buenos Aires mostraron la presencia de glifosato en el 66% de los cuerpos de agua muestreados y AMPA en el 89%. En el material particulado se encontró un 53% de glifosato y un 11% de AMPA (Aparicio *et al.*, 2013); esto indica por una parte la gran afinidad del glifosato y AMPA por el suelo y por otro lado, que por procesos de escorrentía superficial se está transportando glifosato y AMPA a los cuerpos de agua.

El coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}), indica la hidrofobicidad de una molécula, mide la tendencia de un compuesto para separarse entre una fase orgánica y acuosa por lo cual se usa para predecir y modelar la migración de compuestos orgánicos en el suelo y las aguas (Trejo, 2002). Los compuestos con valores bajos de K_{ow} (< 10) se consideran relativamente hidrofílicos mientras que los que tienen un valor de K_{ow} alto ($> 10^4$), son considerados hidrofóbicos y tienden a acumularse en superficies orgánicas como suelos con alto contenido de materia orgánica y especies acuáticas (Van Deuren *et al.*, 2000).

Con los valores de K_{ow} (-4.59 a -1.70) del glifosato, se esperaría que este no se bioacumule (Wang *et al.*, 1994). Sin embargo hay evidencias de que

su bioacumulación puede ser mayor que la predicha con esta constante, debido a la presencia del surfactante POEA (polioxietilenamina) y otros en los ambientes acuáticos (Contardo-Jara *et al.*, 2009), los cuales quizá además de facilitar el ingreso del glifosato dentro de las células de las plantas, podrían incrementar la permeabilidad de membranas de células animales. (Hedberg y Wallin, 2010). Este potencial de bioacumulación ha sido observado en caracoles terrestres (*Helix aspersa*) alimentados con una dieta contaminada con glifosato (Druart *et al.*, 2011) y también tejidos de carpa (*Cyprinus carpio*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) que fueron expuestas a concentraciones relevantes para el ambiente (Wang *et al.*, 1994).

Efectos del glifosato en los organismos

Varios estudios han caracterizado los efectos del glifosato y sus formulados sobre organismos acuáticos (Hartman y Martin, 1985; Gardner *et al.*, 1997; Schaffer y Sebetich, 2004; Relyea, 2005b) y hay evidencias de los diversos efectos fisiológicos y de comportamiento dependiendo de las dosis y la formulación empleada. Estos estudios incluyen microorganismos (Folmar *et al.*, 1979; Kreuzweiser *et al.*, 1989; Tsui y Chu, 2003; Bonnet *et al.*, 2007), protozoos (Bonnet *et al.*, 2007), invertebrados (Trumbo, 2005), anfibios (Thompson *et al.*, 2004; Relyea *et al.*, 2005; Relyea 2005ab; Relyea y Jones, 2009; Moore *et al.*, 2012), peces (Folmar *et al.*, 1979; Mitchell *et al.*, 1987; Servizi *et al.*, 1987; Wan *et al.*, 1989; Modesto y Martínez, 2010a; Gluszcak *et al.*, 2011; Menezes *et al.*, 2011; Hued *et al.*, 2012), y aves (Oliveira *et al.*, 2007).

Microorganismos

En cuanto a microorganismos, hay estudios que demuestran que el aumento de fósforo total generado por el glifosato altera la comunidad del fitoplancton y perifiton (Perez *et al.*, 2007; Vera, 2011, Vera *et al.*, 2010). Igualmente, se ha demostrado que al exponer a glifosato *Vibrio fischeri* y *Skeletonema costatum*, su crecimiento puede resultar inhibido (Tsui y Chu,

2003) lo mismo que el de *Chlorella kessleri* al ser expuesta al formulado de glifosato Atanor (Romero *et al.*, 2011).

Algas

Las algas, por tener similitudes bioquímicas con plantas, son sensibles al glifosato y en estudios realizados para determinar la toxicidad de este herbicida en algas de agua dulce y marina se ha visto que su toxicidad es mayor con el uso de formulados comerciales que tienen surfactantes que con herbicidas con glifosato puro (Saenz y Di Marzio, 2009).

Moluscos y artrópodos

En el caso de moluscos y artrópodos, el glifosato puede reducir las tasas de crecimiento en camarones *Caridina nilotica* expuestos a Roundup (Mensah *et al.*, 2012) y disminuir las reservas de lípidos y proteínas en cangrejos juveniles, *Cherax quadricarinatus* (Avigliano *et al.*, 2014). También puede producir efectos genotóxicos y afectar varios mecanismos fisiológicos como actividades metabólicas y transmisión neuronal en el caracol *Bulinus truncatus*, en el cual además ocasiona efectos adversos sobre la reproducción. (Bakry *et al.*, 2015).

Peces

Los peces son susceptibles a los efectos directos e indirectos de la presencia de herbicidas en el agua ya que sus fuentes de alimento como algas, invertebrados y otros peces pueden verse contaminados (Solomon y Thompson, 2003). Se sabe que en general los adultos son más tolerantes al glifosato que las etapas juveniles (Jiraungkoorskul *et al.*, 2002) y que la mayor toxicidad del glifosato es atribuida al surfactante POEA (Folmar *et al.*, 1979). Se han detectado alteraciones hematológicas y efectos genotóxicos en *Prochilodus lineatus* expuesto a Roundup (Cavalcante *et al.*, 2008; Modesto y Martinez, 2010b); efectos genotóxicos con Roundup para *Anguilla anguilla* (Guilherme *et al.*, 2010); y disminución en la actividad cerebral y la glucosa

hepática en *Leporinus obtusidens* y *Oreochromis niloticus* cuando fueron expuestos a Roundup (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003). También se observó disminución en la actividad muscular y cerebral de *Cyprinus carpio* (Cattaneo *et al.*, 2011), genotoxicidad en *Tilapia rendalli* (Grisolia y Starling, 2001) y daños en eritrocitos del pez dorado del trópico *Corydoras paleatus* (Cavas y Konen, 2007; Ghisi y Cestari, 2013).

Anfibios

De los organismos estudiados, los anfibios son los más sensibles a la exposición ambiental, debido a su fisiología, los tiempos y etapas de reproducción y su distribución en las regiones donde se usa el glifosato. Hay estudios en *Rana catesbeiana* y *Rana clamitans*, con comprobadas dosis letales LC₅₀ de Roundup a diferentes concentraciones (Relyea y Jones, 2009; Moore *et al.*, 2012); Howe *et al.*, 2004 también encontraron daños en gónadas y anomalías como disminución en la tasa de desarrollo en esta misma especie *Rana clamitans* y daños en el ADN de la rana *Eleutherodactylus johnstonei* (Meza-Joya *et al.*, 2013).

Reptiles y mamíferos

Hay estudios que hablan de daños por glifosato en huevos del caimán *Caiman latirostris* (Poletta *et al.*, 2009) e inhibición de citocromo P450 hepático en ratas (Hietanen *et al.*, 1983), así como disminución de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en eritrocitos humanos por la exposición a glifosato (Kwiatkowska *et al.*, 2014).

Todos los estudios mencionados evidencian con claridad que el glifosato tiene un efecto negativo en los cuerpos de agua y en los organismos que dependen de éstos, al modificar la calidad del agua y afectar el equilibrio de los ecosistemas eutrofizándolos, así como al ocasionar efectos fisiológicos, genotóxicos y sobre los ciclos reproductivos de los animales.

Biofilms bacterianos

Los procesos de degradación de glifosato y otros compuestos xenobióticos ocurren de forma natural en el ambiente en su mayoría mediados por bacterias. Las bacterias en general cumplen un papel fundamental en la regeneración y movilización de nutrientes en los ecosistemas acuáticos (Newton *et al.*, 2011), así como también en los procesos de degradación y mineralización de compuestos orgánicos e inorgánicos, afectando la calidad del agua (Cole *et al.*, 1988; Cotner y Biddanda., 2002).

Generalmente las bacterias se encuentran dentro de matrices de polisacáridos llamadas biofilms, lo cual facilita su adherencia a las superficies y también entre células para formar comunidades bacterianas (Denyer *et al.*, 1993; Costerton *et al.*, 1994). Así en una secuencia de acontecimientos físicos y biológicos que empieza con la adsorción de películas orgánicas, se van realizando los procesos de colonización de las superficies. En la naturaleza, estos biofilms contribuyen a que los organismos se puedan desarrollar formando verdaderos tapetes de microorganismos (Stal, 1994), en los que se dan interacciones potenciales positivas y negativas como por ejemplo competencia, cooperación, inhibición y sinergismo, las cuales se definen típicamente en relación a la utilización del sustrato y permiten que las poblaciones cambien constantemente generando procesos de sucesión de especies. De esta manera, los microorganismos del biofilm responden a condiciones microambientales específicas con diferentes modelos de crecimiento (Atlas y Bartha, 2005).

Estudios realizados sobre caracterización y evolución de las comunidades de biofilm expuestas a herbicidas, sugieren que la biodiversidad microbiana de los biofilms acuáticos podría actuar como un micro-ecosistema capaz de regular y adaptarse a la concentración de glifosato en agua, de tal forma que las comunidades bacterianas adaptadas al glifosato cambien su composición (Bricheux *et al.*, 2012).

Grupos bacterianos degradadores de glifosato

Las bacterias pueden degradar glifosato por medio de dos rutas. La principal ruta produce ácido aminometilfosfónico (AMPA) (Cox, 1995) el cual posteriormente se convierte en dióxido de carbono y amonio; hay otra ruta alternativa menos común, la cual es realizada por algunas especies de bacterias del suelo (Kishore y Jacob, 1987), en la cual el glifosato primero es metabolizado en fosfato inorgánico y sarcosina, para luego transformarse en glicina. (Dick y Quinn, 1995). (Figura 10).

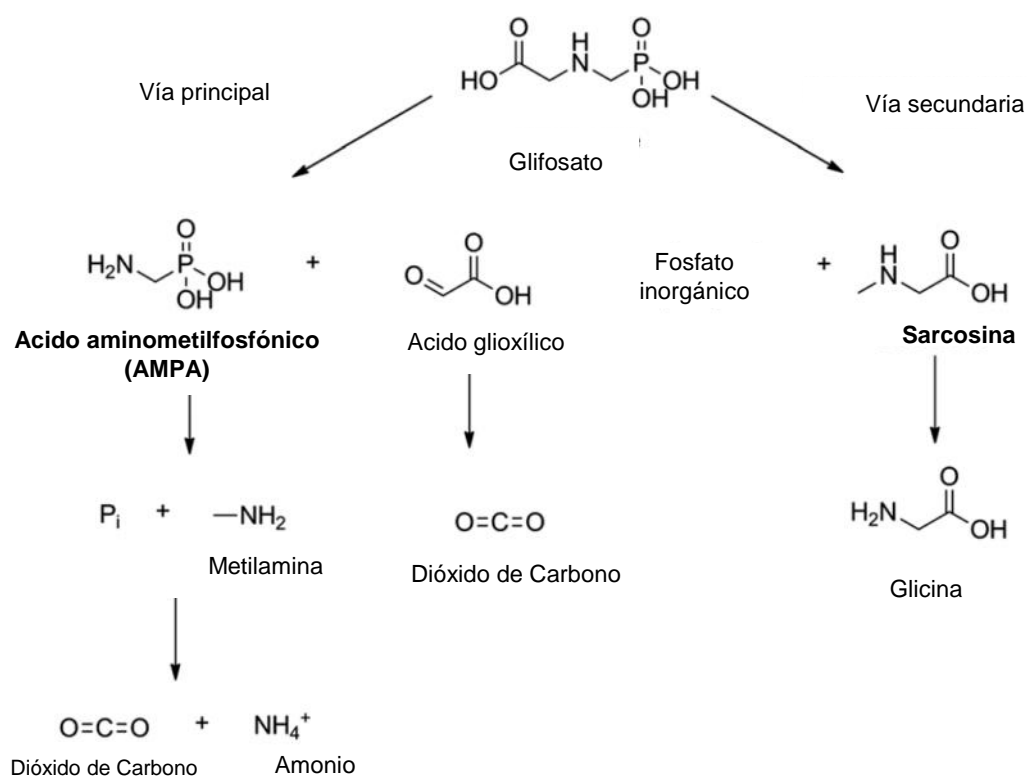


Figura 10. Rutas de degradación bacteriana de glifosato.

Fuente: Adaptado de Annet *et al.* (2014).

Las bacterias degradadoras de glifosato (tabla 1), lo emplean como fuente de carbono, nitrógeno y fósforo para realizar sus procesos metabólicos (Cuervo, 2007; Bazot y Lebeau, 2008; Krzysko-Lupicka y Sudol, 2008). Las especies más citadas como degradadoras de glifosato pertenecen a la clase Gamaproteobacteria: *Pseudomonas* sp 4ASW (Dick-Quinn, 1995a); *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Burkholderia gladioli* y *Flavimonas oryzae*, así como ciertos consorcios bacterianos: *P. fluorescens*+ *P.*

aeruginosa y *B. gladioli*+ *P. fluorescens*+ *F. oryzihabitans* (Martínez *et al.*, 2012) y algunas Actinobacterias y Betaproteobacterias.

Tabla 1. Publicaciones relacionadas con bacterias degradadoras de glifosato.

Especie bacteriana	Clase	Trabajo publicado
<i>Burkholderia</i> sp.	Betaproteobacteria	(Jacobsen y Hjelms, 2014)
<i>Enterobacter cloacae</i> K7	Gamaproteobacteria	(Kryuchkova <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Gamaproteobacteria	(Martínez <i>et al.</i> , 2012)
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Gamaproteobacteria	
<i>Burkholderia gladioli</i>	Betaproteobacteria	
<i>Pseudomonas</i> sp. 4ASW.	Gamaproteobacteria	(Dick y Quinn., 1995)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Gamaproteobacteria	(Liu <i>et al.</i> , 1991)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Gamaproteobacteria	(Jacob <i>et al.</i> , 1988)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Gamaproteobacteria	(Moore <i>et al.</i> , 1983)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Gamaproteobacteria	(Travaglia <i>et al.</i> , 2015)
<i>Streptomyces</i> sp.	Actinobacteria	(Forlani <i>et al.</i> , 1999)
<i>Arthrobacteratrocyaneus</i> ATCC 13752	Actinobacteria	(Amrheint <i>et al.</i> , 1988)

Especie bacteriana	Clase	Trabajo publicado
<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria	(Pipke <i>et al.</i> , 1987)
Gemmatimonas. sp.	Alfaproteobacteria	(Arango <i>et al.</i> , 2013).
<i>Consortio microbiano</i>	Consortio microbiano	(Hallas <i>et al.</i> , 1992)

Análisis de grupos bacterianos

Para el estudio de identificación y cuantificación de grupos bacterianos una de las técnicas más empleadas hoy en día es la técnica de biología molecular CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *in situ* Hybridization) (Pernthaler *et al.*, 2002; 2004), la cual consiste en la hibridación de sondas específicas con el ARN ribosomal de las bacterias en estudio. Estas sondas conocidas están marcadas con la enzima Horse radish Peroxidase (HRP) la cual permite amplificar y emitir una señal fluorescente y estable que luego posibilita observar y cuantificar las células bacterianas mediante un microscopio de epifluorescencia. (Figura 11).

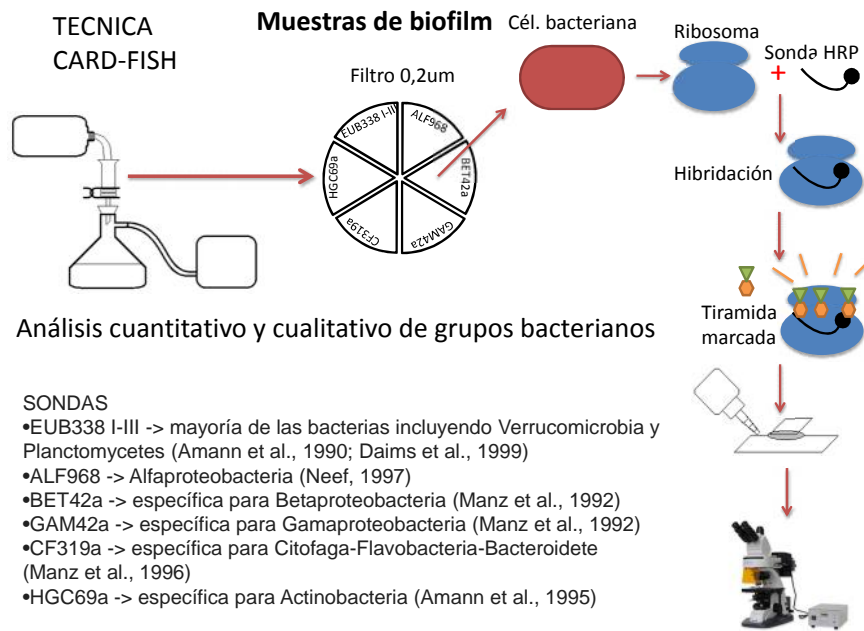


Figura 11. Esquema de la técnica CARD-FISH. Fuente Saad (2016) Comunicación personal

Bacterias del ecosistema de agua dulce

En los ecosistemas de agua dulce, diferentes grupos conforman la diversidad bacteriana, siendo los más representativos Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria, Actinobacteria y Bacterioidetes, los cuales están incluidos dentro del grupo Eubacteria. A continuación se describen algunas características de estos grupos los cuales fueron objeto de este estudio de identificación del biofilm bacteriano de las valvas de *Limnoperna fortunei*.

Actinobacterias

Las Actinobacterias son bacterias gram positivas. Antes se consideraba que estaban presentes sólo en el suelo, pero mediante estudios de genética y biología molecular se ha comprobado su presencia abundante en diversos ambientes acuáticos, tales como ríos, mares salobres, bahías y en ambientes de hielo glacial. (Hiorns *et al.*, 1997; Zwart *et al.*, 1998; 2002; Denisova *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000), contribuyendo con más del 50% de las bacterias en aguas de superficie (epilimnion) (Glöckner *et al.*, 2000) y aunque

también están presentes en el hipolimnion , allí su abundancia suele ser menor ya que son dependientes de la concentración de oxígeno (Allgaier y Grossart, 2006; Taipale *et al.*,2009). Estas bacterias tienen una distribución cosmopolita (Newton *et al.*, 2011) y se han encontrado en lagos oligotróficos (Humbert *et al.*, 2009), mesotróficos (Debroas *et al.*, 2009, Humbert *et al.*, 2009, Zeder *et al.*, 2009), eutróficos y distróficos (Wu *et al.*, 2007). En lo que respecta a la distribución geográfica, se han hallado en lagos de Norteamérica (Newton *et al.*, 2007), Europa (Glöckner *et al.*, 2000), Africa (De Wever *et al.*, 2005; 2008; Humbert *et al.*, 2009), Asia (Hahn *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006; Nishimura y Nagata, 2007;), Australia (Hahn y Pöckl, 2005.), America del sur (Corno *et al.*, 2009) y Antártida (Pearce *et al.*, 2003; 2005). Un factor que favorece su amplia distribución es su pequeño tamaño (menor a 0.1 μm) y la composición de su pared celular (Newton *et al.*, 2011), así como su resistencia al estrés ambiental y a factores como la radiación UV, lo cual les permite desarrollarse en ambientes con alta transparencia como los lagos de alta montaña (Warnecke *et al.*, 2005); pueden vivir en diferentes rangos de pH (Lindström *et al.*, 2005; Newton *et al.*, 2007) y también tienen la capacidad de desarrollar esporas lo que les permite sobrevivir periodos de desecación y distribuirse por el aire (Newton *et al.*, 2011). Las actinobacterias no se han encontrado en asociación con cianobacterias pero pueden formar parte de la comunidad del bacterioplancton durante las floraciones de fitoplancton (Allgaier y Grossart, 2006; Salcher *et al.*, 2010). Se han reportado algunos taxones de Actinobacteria relacionados con la degradación de glifosato, tales como *Streptomyces* sp. (Forlani *et al.*, 1999), *Arthrobacter atrocyaneus* (Amrheint *et al.*, 1988), *Arthrobacter* sp y *A. atrocyaneus* (Pipke *et al.*, 1987; 1988).

Bacteroidetes

El phylum bacteroidetes, Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes (CFB) tiene enorme diversidad fenotípica y metabólica. Los miembros de este phylum se pueden encontrar en diferentes ambientes, tales como suelo, ambientes acuáticos o como simbioses de plantas y animales (Newton *et al.*, 2011). Dominan las comunidades bacterianas de agua dulce (Pernthaler *et al.*, 2004) y están asociados a partículas del epilimnion donde pueden cumplir un

papel importante en la degradación de biopolímeros (Kirchman, 2002) y de materias húmicas (Hutalle-Schmelzer *et al.*, 2010). No tienen un patrón de distribución estacional específico (Eiler y Bertilsson, 2007), pero sí dependen de la disponibilidad de materia orgánica adaptándose bien en ambientes con altos contenidos de nutrientes (Zeder *et al.*, 2009). Son abundantes después de periodos de floraciones de cianobacterias y también se sabe que podrían estar involucradas en procesos de degradación de materia orgánica (Newton *et al.*, 2011). En la revisión bibliográfica realizada no se encontraron géneros de este phylum relacionados con la degradación de glifosato.

Proteobacteria

El phylum Proteobacteria es un grupo de bacterias Gram-negativas que abarca la mayoría de bacterias reconocidas por su importancia agrícola, industrial y médica por lo cual están ampliamente estudiados. Dentro de este phylum se incluyen las Alfa, Beta, Gama, Delta, Epsilon y Zetaproteobacterias (Newton *et al.*, 2011).

Alfaproteobacteria

La clase Alfaproteobacteria tiene un papel especial en la evolución y microbiología, ya que se cree que las mitocondrias eucariotas se originaron a partir de un simbiote alfaproteobacterial (Andersson *et al.*, 1998). Se encuentran en todos los hábitats imaginables y muestran enorme plasticidad en sus genomas y en sus estilos de vida, lo cual está probablemente relacionado por su función endosimbiótica y de parásito intracelular. De igual forma son importantes en el ciclo del nitrógeno facilitando su fijación en asociación con las plantas. Son dominantes en ecosistemas marinos pero también se encuentran presentes en ambientes de agua dulce aunque en menor proporción. Crecen bien en ambientes oligotróficos y compiten por sustratos orgánicos e inorgánicos. (Alonso y Pernthaler 2006a,b; Newton *et al.*, 2011). Algunos miembros de esta clase como *Novosphingobium sphingopyxis* tienen la capacidad de degradar compuestos orgánicos como sustancias húmicas para satisfacer su demanda de nutrientes y carbono (Newton *et al.*, 2011). También se ha demostrado que las Alfaproteobacterias tienen fuertes interacciones

funcionales y algunas pueden promover e inhibir el crecimiento y la floración de cianobacterias. (Berg K.A *et al.*, 2009). En la revisión bibliográfica realizada, solo encontramos un género relacionado con la degradación de glifosato: *Gemmatimonas* sp (Arango *et al.*, 2014).

Betaproteobacteria

La clase Betaproteobacteria es reconocida por su diversidad morfológica y fisiológica. Son bacterias de rápido crecimiento y tienen una distribución cosmopolita; son un grupo dominante en ambientes de agua dulce y poco abundante en el océano, y por esa razón es uno de los grupos de ambientes de agua dulce más estudiados. Algunos géneros de Betaproteobacteria son quimiorganotrofos aeróbicos y anaeróbicos facultativos con capacidad para asimilar glucosa y una variedad de pequeños ácidos orgánicos tales como acetato, piruvato y fumarato (Hahn *et al.*, 2010). En cuanto a su capacidad de degradación de glifosato, se ha reportado al género *Burkholderia* en estudios realizados en el suelo (Martínez *et al.*, 2012; Jacobsen y Hjelms, 2014).

Gamaproteobacteria

Esta clase incluye a las bacterias que han sido más estudiadas, tales como los Enterobacteriales, Pseudomonadales y Xantomonadaceas. En este grupo se encuentra *Escherichia coli* la cual tiene gran importancia médica y para la investigación. La clase Gamaprotetobacteria está presente en ecosistemas de agua dulce, así como en ambientes marinos y en el suelo. De igual manera se pueden encontrar bacterias de este grupo de manera transitoria en algunas comunidades de lagos, en especial por procesos de contaminación antrópica.

Las Gamaproteobacterias tienen altos requerimientos nutricionales (Zavarzin *et al.*, 1991) y tienen gran importancia en los estudios relacionados con contaminación de ambientes acuáticos y en la degradación de sustancias contaminantes. Están ampliamente citadas por su capacidad degradadora de glifosato en estudios realizados con diferentes formulados y también con glifosato puro. Los taxones más representativos en cuanto a este proceso son

Pseudomonas sp. (Moore *et al.*, 1983; Jacob *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1991; Dick y Quinn, 1995a; Martínez *et al.*, 2012; Travaglia *et al.*, 2015), *Flavimonas oryzihabitans* (Martínez *et al.*, 2012) y *Enterobacter* (Kryuchkova *et al.*, 2014).

Objetivos e hipótesis del estudio

En esta tesis analizamos algunos aspectos de interacción del mejillón dorado *Limnoperna fortunei* y el herbicida glifosato, dos factores de cambio antropogénicos, enfocándonos en el papel que cumplen los grupos bacterianos presentes en el biofilm de las valvas del mejillón, sobre la concentración de glifosato en los ecosistemas de agua dulce.

El objetivo del estudio fue:

Analizar los cambios en la comunidad bacteriana del biofilm asociado a las valvas del molusco invasor *Limnoperna fortunei* en presencia del herbicida glifosato. Se plantearon las siguientes hipótesis y sus correspondientes predicciones:

H1. El efecto del mejillón sobre la concentración del glifosato en agua es diferente respecto de sus valvas solas.

Predicción: En presencia de mejillón entero habrá una mayor disminución de glifosato que en presencia de valvas solas.

H2. Las bacterias presentes en el biofilm de las valvas del mejillón tienen la capacidad de degradar el herbicida glifosato.

Predicción: El glifosato presente en el agua disminuirá tanto en presencia de mejillón entero como en presencia de sus valvas solas, por lo tanto esta disminución se puede atribuir a bacterias presentes en el biofilm.

H3. El glifosato modifica la estructura del biofilm bacteriano asociado a las valvas de *Limnoperna fortunei*.

Predicción: En presencia de glifosato se incrementará la abundancia de bacterias capaces de degradarlo.

H4. El metabolismo del molusco invasor, mediante la excreción de nutrientes tiene un efecto sobre la composición bacteriana.

Predicción: En presencia del molusco se prevé una estimulación del crecimiento bacteriano.

H5. La acción conjunta del herbicida y el molusco invasor tendrá un efecto diferencial sobre el biofilm respecto de cada uno de los factores por separado.

Predicción: Ambos factores actuando conjuntamente tendrán un efecto sinérgico sobre la estructura del biofilm.

MATERIALES Y MÉTODOS

*Experimento de exposición de *Limnoperna fortunei* al glifosato*

Para analizar el efecto del glifosato, del molusco y su interacción sobre la abundancia y composición bacteriana del biofilm asociado a las valvas del mejillón dorado, se llevaron a cabo bioensayos semi estáticos bajo condiciones controladas de laboratorio en una cámara de ensayo ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) (Figura 12). El efecto del factor “mejillón” fue evaluado en tres niveles: mejillones enteros (M), valvas vacías (V) y sin mejillón (C). El factor “concentración de glifosato” fue evaluado en dos niveles: Con glifosato 20 mg L^{-1} (G) y sin herbicida. Cada tratamiento (C, G, M, V, MG, VG) se realizó por triplicado, contando en total 18 unidades experimentales.



Figura 12: Cámara de cultivo para los distintos tratamientos en condiciones controladas de laboratorio.

Los ejemplares de *Limnoperna fortunei* fueron recolectados manualmente en el delta inferior del río Paraná ($34,428872^{\circ}\text{S}$; $58,547101^{\circ}\text{W}$),

trasladados inmediatamente al laboratorio y alojados en acuarios con abundante agua de red de clorada y aireada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para el ensayo se seleccionaron sólo aquellos animales que al contacto con el agua abrieron inmediatamente sus valvas, extendieron sus sifones y comenzaron a desarrollar una filtración activa. De este grupo, los organismos para cada uno de los tratamientos fueron seleccionados al azar.

La concentración del glifosato seleccionada para el ensayo representa el peor de los escenarios posibles 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, 2010).

El tiempo de exposición de los distintos tratamientos fue de siete días y como cámaras de ensayo, se utilizaron recipientes plásticos de 2,5 litros de capacidad con aireación constante. En cada cámara experimental que contenían animales enteros (M y MG) se alojaron 10 moluscos seleccionados al azar con talla media $23,70 \pm 3\text{mm}$. En los tratamientos con valvas solas (V y VG) se agregaron 10 pares de valvas vacías seleccionadas al azar del mismo grupo de organismos y de la misma talla media que en el tratamiento anterior. Las valvas vacías utilizadas para el ensayo, se obtuvieron mediante una cuidadosa disección para extraer el tejido blando del animal sin alterar el biofilm asociado a las valvas de los moluscos. (Figura 13)

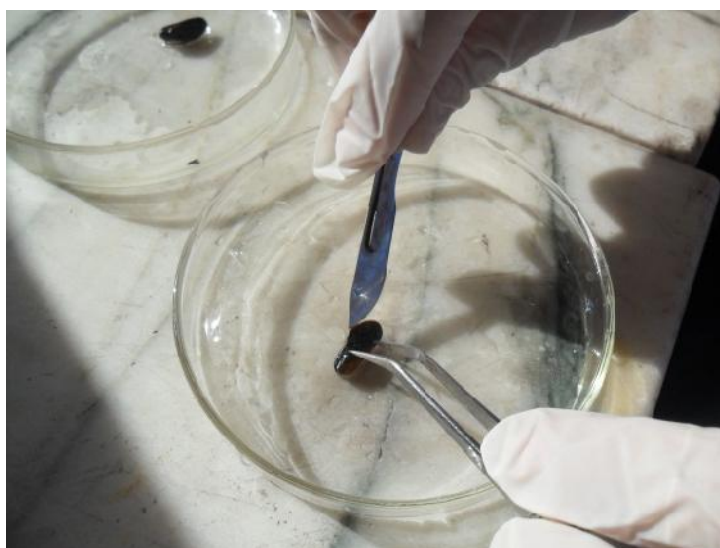


Figura 13: Disección de *Limnoperna fortunei* para el experimento.

Determinación de nutrientes

A tiempo inicial y final de la experiencia, además de los parámetros fisicoquímicos básicos del agua, (T° , pH, conductividad, oxígeno disuelto) se cuantificó la concentración de nutrientes inorgánicos disueltos: nitrito+nitrato ($N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$), amonio ($N-NH_4^+$) y fósforo reactivo soluble ($P-PO_4^-$), así como la concentración de glifosato.

Los nutrientes disueltos fueron determinados, a partir de muestras filtradas previamente con filtros de fibra de vidrio tipo Whatman® GF/F, con un espectrofotómetro Hach® DR/2010 (Hach Company, USA), utilizando los kits de reactivos Hach® correspondientes. Para el fósforo reactivo soluble ($P-PO_4^-$) se empleó el método de ácido ascórbico, el nitrato + nitrito ($N-NO_3^- + N-NO_2^-$) se determinó 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 $0,001 \text{ mg L}^{-1}$.

Determinación de glifosato

La determinación de glifosato y su metabolito principal AMPA en las muestras iniciales y finales de los distintos tratamientos, fueron realizadas en el INQUIMAE-UBA por HPLC-UV, previa derivatización con 9-fluorenilmetilo cloroformiato (FMOC-Cl) (Sancho *et al.*, 1996; Stalikas y Konidari, 2001). La reacción de derivatización se realizó mezclando 3,75 ml de la muestra con 0,625 ml de buffer borato 0,04 M y pH 9. Posteriormente se adicionaron 0,625 ml de solución de FMOC-Cl y se agitó hasta homogeneizar. Esta mezcla se mantuvo durante tres horas en oscuridad y a temperatura ambiente para que ocurriera la reacción y luego fue interrumpida adicionando 5ml de diclorometano. Posteriormente la mezcla fue agitada vigorosamente por varios minutos con el fin de eliminar el exceso de solución de FMOC-Cl en la fase acuosa. La muestra fue almacenada finalmente a 4°C hasta la determinación de los productos.

En todos los casos, las curvas de calibración fueron llevadas a cabo usando la misma matriz (agua de las unidades experimentales) para evitar cualquier efecto aditivo de la matriz.

Los análisis de HPLC fueron realizados usando el equipo de HPLC-UV (Jasco Analytical Instruments, Easton MD, USA). Las fases móviles utilizadas fueron Acetato de amonio 5 mM (A) y acetonitrilo (B) y la detección de los productos se efectuó a 265 nm.

Vida media del glifosato

La vida media del herbicida en cada tratamiento se calculó asumiendo una cinética química de primer orden, mediante un ajuste a una función logarítmica de acuerdo la siguiente ecuación:

$$[Gli_{Tf}] = [Gli_{Ti}] * e^{-kt}$$

donde:

[Gli_{Tf}] y **[Gli_{Ti}]**: son las concentraciones de glifosato a tiempo final e inicial, respectivamente

k: es el coeficiente de disipación y

t: es el tiempo.

Tasa de disipación del glifosato

La tasa de degradación de glifosato (mg glifosato/Peso seco*día), para los tratamientos en los que se dio reducción del herbicida: Valva+glifosato (VG) y Mejillón+Glifosato (MG), se calculó correlacionando la vida media del glifosato, con el peso seco y los días de duración del ensayo. El peso seco se obtuvo mediante el secado de los mejillones utilizados en el experimento en estufa (60°C) hasta peso constante, usando una balanza digital KERN modelo ARS 120-4 (error 0,0001 g).

Cuantificación e identificación de grupos de bacterias presentes en el biofilm, mediante la técnica de CARD-FISH.

Obtención y fijación de las muestras

Para la obtención de la muestra del biofilm bacteriano asociado a las valvas de los organismos, en el tiempo inicial y el tiempo final, se realizó un cuidadoso raspado de los 10 pares de valvas de cada unidad experimental, con la ayuda de un cepillo y un bisturí, lavando con agua Mili-Q hasta obtener un volumen de 100 ml de muestra en cada tratamiento.(Figura 14)

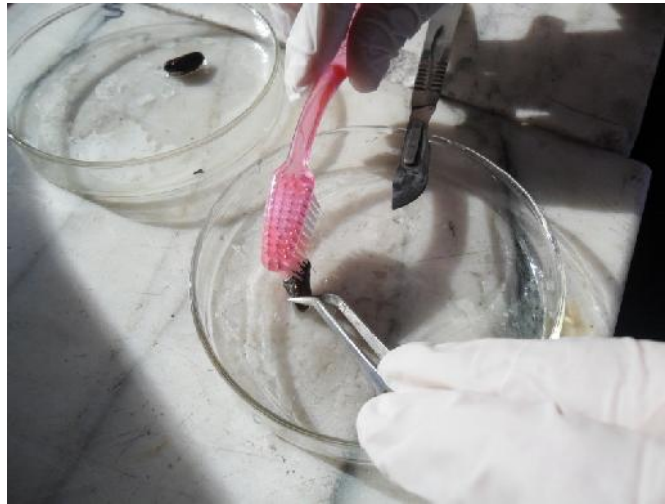


Figura 14. Obtención de la muestra de biofilm de las valvas de *Limnoperna fortunei*

Las muestras fueron fijadas con 10 ml de formaldehído (37%) y almacenadas a 4°C durante 24 hs, posteriormente se sonicaron 3 veces, empleando un sonicador (SONICS Vibra Cell, modelo VCX 130PB, frecuencia: 20 KHz), a 35% de amplitud durante 10 segundos cada una, con el fin de disgregar el material y de esta manera lograr una buena separación de las bacterias del biofilm. Este procedimiento es el adecuado para obtener una buena cuantificación de bacterias mediante el microscopio de epifluorescencia.

A fin de establecer cuál era la concentración de bacterias más adecuada para realizar la cuantificación por epifluorescencia, se realizaron pruebas previas con distintas diluciones mediante el agregado de agua mili-Q y se

sonicó nuevamente a 35% de amplitud durante 3 veces por una duración de 10 segundos cada una.

Por último se realizó el filtrado de 2 ml de la muestra final a través de filtros blancos de policarbonato de 0,2 μm de poro (MILLIPORE 0,2 μm GTTP), y estos se mantuvieron a $-20\pm 1^\circ\text{C}$ hasta su procesamiento.

Hibridación de las muestras empleando CARD-FISH

Las hibridaciones *in situ* de distintas porciones de los filtros se realizaron siguiendo los protocolos de la técnica de CARD-FISH según Pernthaler *et al.* (2002) y Sekar *et al.* (2003) y usando las siguientes sondas de oligonucleótidos: EUB338-II-III, para hibridar la mayoría de las bacterias incluyendo Verrucomicrobia y Planctomycetes (Amann *et al.*, 1990; Daims *et al.*, 1999); ALF968, específica para Alfabroteobacterias (Neef, 1997); BET42a, específica para Betaproteobacteria (Manz *et al.*, 1992); GAM42a, para hibridar Gamaproteobacteria (Manz *et al.*, 1992); CF319a, para hibridar al grupo Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes (Manz *et al.*, 1996); HGC69a, específica para Actinobacteria (Amann *et al.*, 1995). Para las Actinobacterias, Betaproteobacterias y Gamaproteobacterias se utilizaron sondas competidoras que no poseían la enzima HRP. Luego de la hibridación, la señal fue amplificada con tiramida marcada con Alexa 488 y las bacterias totales teñidas con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Las sondas utilizadas se unen al ARN ribosomal de las células bacterianas y la enzima HRP que llevan unida cataliza una reacción de amplificación de la tiramida marcada que se pone como sustrato, provoca que un gran número de moléculas fluorescentes se unan a las proteínas de membrana de las células generando una señal brillante y estable.

Las porciones de los filtros hibridadas con distintas sondas fueron montadas entre porta y cubre objetos y observadas al microscopio de epifluorescencia (Olympus BX40F4) bajo luz azul y excitación con UV a fin de cuantificar los distintos grupos bacterianos en cada muestra. Los resultados

fueron expresados en células por unidad de superficie (mm^2) para lo cual se hizo el cálculo del área planar de las valvas.

Los porcentajes de hibridación para los grupos bacterianos se calcularon estableciendo la proporción de las bacterias hibridadas con las sondas específicas, con respecto a los recuentos totales de cada muestra.

Cálculo del área planar de las valvas

Para el cálculo del área planar de las valvas de *Limnoperna fortunei*, se seleccionaron al azar 10 valvas de los organismos empleados en el ensayo. En cada una de las valvas se seleccionaron entre 12 y 16 puntos de la cara interna, a las cuales se les midió la profundidad del espacio interno, y el espesor de la valva empleando un calibre digital de 0,01 mm de precisión (sylvac MOD S 235 PAT) (Figura 15).



Figura 15. Medición de la talla de las valvas de *Limnoperna fortunei*, utilizadas en el ensayo.

Las imágenes de estas valvas fueron digitalizadas y procesadas mediante el programa Surfer 8, para obtener el área planar y la superficie. (Figura 16) Posteriormente se calculó la relación funcional entre el área planar y la superficie de la valva y a partir de esta relación se estimaron por interpolación la superficie de todas las valvas utilizadas en el experimento.

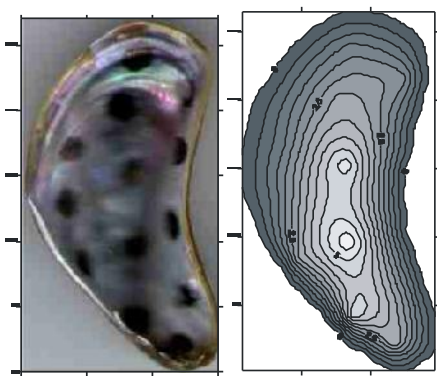
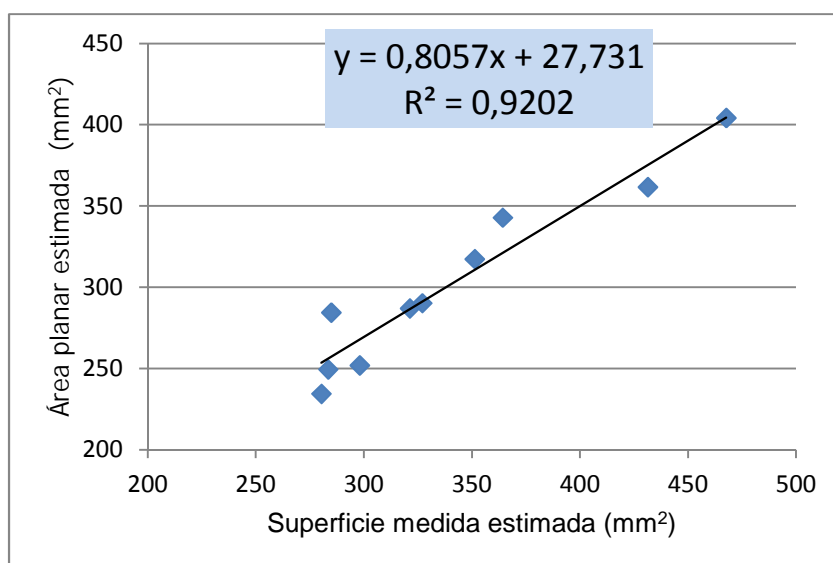


Figura 16. Imagen digitalizada de una de las valvas de *Limnoperna fortunei*, por medio del programa Surfer, para calcular su área planar. La primera imagen corresponde a los puntos seleccionados para determinar la profundidad de la cara interna de la valva. La segunda imagen representa las líneas de nivel generadas por el programa Surfer 8 utilizadas para la estimación del área planar de la cara externa de la valva.

Tratamiento estadístico

El efecto de los diferentes tratamientos sobre cada uno de los grupos bacterianos estudiados fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de un factor, realizando contrastes ortogonales según las hipótesis de cada caso (Zar, 1996), evaluando previamente los supuestos del modelo.

También se llevó a cabo un PCA (Análisis de Componentes Principales) para el ordenamiento de los tratamientos empleados (M, MG, V, y VG),

tomando como variable la abundancia de los grupos bacterianos. Se utilizó una matriz de correlación para estandarizar los datos y dar mayor relevancia a la proporción de cada grupo de bacterias.

La concentración de glifosato en agua y su producto de degradación AMPA en los distintos tratamientos a tiempo inicial y final, fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de un factor, evaluando previamente los supuestos del modelo.

Para las comparaciones de la concentración de nutrientes inorgánicos disueltos: nitrito+nitrato (N-NO_2^- y N-NO_3^-), amonio (N-NH_4^+) y fósforo reactivo soluble (P-PO_4^-) en los distintos tratamientos, se realizaron ANOVAS de un factor, según las hipótesis de cada caso y evaluando los supuestos de modelo.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el Software InfoStat.

RESULTADOS

Características físicas y químicas del agua

En la Tabla 2 se presentan los valores promedios de las variables físicas y químicas del agua al comienzo de la experiencia en las unidades experimentales con glifosato (G, VG, MG) y sin glifosato (C, V, M). Estas se mantuvieron con aireación y temperatura constante durante todo el experimento.

Tabla 2. Características físicas y químicas del agua al comienzo de la experiencia en las unidades experimentales con y sin glifosato. Los valores corresponden a las medias \pm desvío estándar.

Variable	Control (sin glifosato)	Con glifosato (20ppm)
pH	7,28 \pm 0,09	6,54 \pm 0,03
O ₂ disuelto (mg L ⁻¹)	6,31 \pm 0,02	5,30 \pm 1,75
Conductividad (μ S/cm)	255,00 \pm 6	269,33 \pm 3,06
Temperatura (°C)	26,23 \pm 0,06	26,23 \pm 0,06
P-PO ₄ (mg L ⁻¹)	0,103 \pm 0,02	0,110 \pm 0,01
N-NO ₃ (mg L ⁻¹)	0,060 \pm 0,01	0,060 \pm 0,01
N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	0,003 \pm 0,01	0,003 \pm 0,01

Concentración de glifosato

Al comienzo del ensayo en las unidades experimentales con agregado de herbicida (G, VG y MG), la concentración de glifosato fue semejante en todos los tratamientos ($P > 0,05$) ($20,4 \pm 0,7$ mg L⁻¹). Por su parte, al final de la experiencia en G la concentración de glifosato no varió significativamente respecto de la inicial ($21,1 \pm 0,6$ mg L⁻¹), mientras que en los tratamiento VG y MG se observó una significativa reducción en la concentración del herbicida ($P < 0,05$ en ambos casos). A tiempo final, la concentración de glifosato en el tratamiento con mejillón entero, fue significativamente menor que en presencia

de la valva sola ($P < 0,05$ contrastes ortogonales) (MG: $9,2 \pm 1,05 \text{ mg L}^{-1}$; VG: $11,4 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$). (Figura 17). Por otro lado en los tratamientos C, V y M las concentraciones de glifosato se mantuvieron por debajo del límite de detección ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), para ambos tiempos.

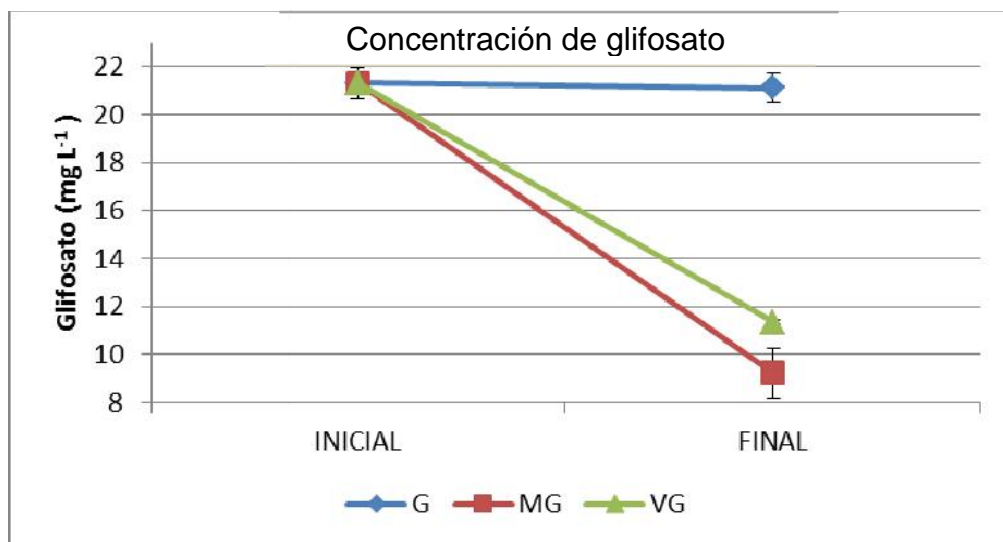


Figura 17. Valores medios de concentración de glifosato (mg L^{-1}) al inicio y al final de la experiencia en los tratamientos Glifosato (G), Mejillón + Glifosato (MG) y Valva + Glifosato (VG). Las barras de error representan desvío estándar.

Concentración de AMPA (ácido aminometilfosfónico)

Al inicio de la experiencia no se detectó la presencia de AMPA en ninguna de las unidades experimentales (límite de detección $0,1 \text{ mg L}^{-1}$), mientras que al tiempo final, la concentración de AMPA se incrementó significativamente ($P < 0,05$) en los tratamientos MG y VG con respecto al control de glifosato (G), en el cual no se detectó la producción de este metabolito. Por otro lado, la concentración de AMPA fue significativamente mayor en presencia de valva + glifosato que con el mejillón entero+glifosato ($P < 0,05$) ($3,7 \pm 0,153 \text{ mg L}^{-1}$ y $2,7 \pm 0,115 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente) (Figura 18).

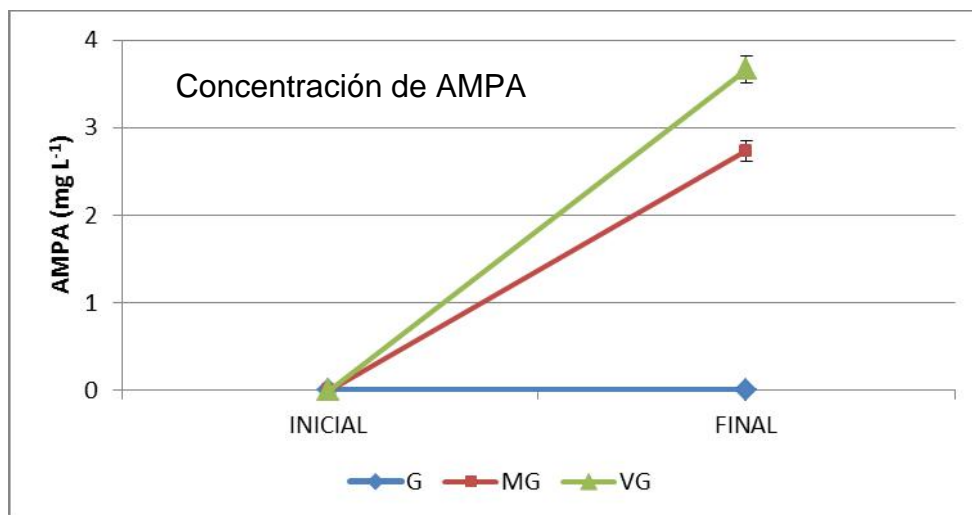


Figura 18. Valores medios de concentración de AMPA (mg L^{-1}) al inicio y al final de la experiencia en los tratamientos Glifosato (G), Mejillón + Glifosato (MG) y Valva + Glifosato (VG). Las barras de error representan desvío estándar.

Vida media del glifosato

Ajustando los valores de concentración de glifosato vs. tiempo a una ecuación de cinética química de 1^{er} orden con función logarítmica, se determinó que la tasa de disipación del glifosato (k) en tratamientos VG y MG fue de $0,09 \pm 0,002 \text{ mg día}^{-1}$ y $0,11 \pm 0,003 \text{ mg día}^{-1}$, respectivamente. La vida media de la concentración de glifosato en el tratamiento Mejillón+Glifosato (MG), de 5,78 días, fue significativamente menor a la obtenida en el tratamiento Valvas+Glifosato (VG) (7,70 días) ($P < 0,0001$).

Debido a que la disminución de la concentración de glifosato al cabo de la experiencia en el tratamiento que contenía solo herbicida fue muy baja (reducción de la concentración del 0,94%), no se pudo estimar dicha tasa ni la vida media del glifosato en el tratamiento G.

Tasa de disipación de glifosato

La tasa de disipación de glifosato para los tratamientos en los que se dio reducción del herbicida fue mayor para el tratamiento Mejillón glifosato: $4,26 \pm 0,56$ mg glifosato/Peso seco*día, comparado con el tratamiento Valva+glifosato (VG): $3,48 \pm 0,13$ mg glifosato/Peso seco*día.

Fosfatos (P-PO₄)

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de fosfatos en los tratamientos con agregado de glifosato (G, VG, MG) y sin glifosato (C,M,V) al inicio de la experiencia ($0,107 \pm 0,012$ mg L⁻¹). Al tiempo final sólo se observó un aumento significativo de esta variable en el tratamiento MG ($P < 0,05$ Kruskal-Wallis ANOVA) ($0,210 \pm 0,01$ mg L⁻¹). (Figura 19).

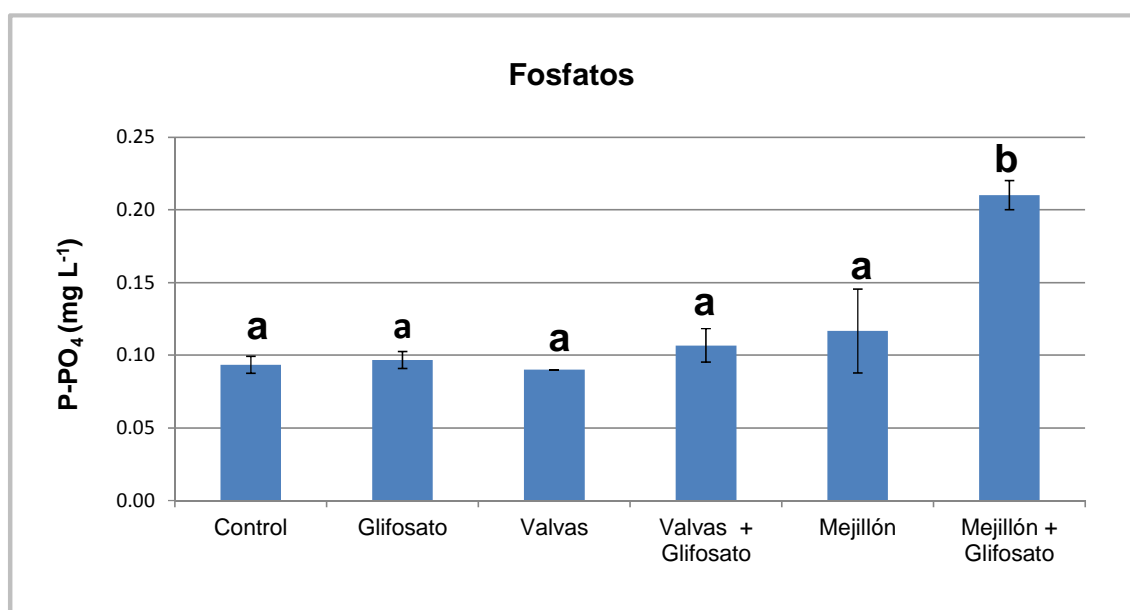


Figura 19. Valores medios de Ccntración de fosfatos en los distintos tratamientos al tiempo final del experimento. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Kruskal-Wallis ANOVA $P < 0,05$). Las barras de error representan desvío estándar.

Nitratos (N-NO₃)

Al inicio de la experiencia no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con agregado de glifosato (G, VG, MG) y sin glifosato (C, M, V). Por su parte, a tiempo final no se observaron diferencias entre los tratamientos control (C) y glifosato (G) así como tampoco entre valvas (V) y valvas+glifosato (VG) ($P > 0,05$ en ambos casos), pero sí entre estos dos pares de grupos ($P < 0,05$).

Por otro lado, las más altas concentraciones de nitratos, significativamente mayores que el resto de los tratamientos, fueron detectadas en los tratamientos con mejillón (M) y mejillón+glifosato (MG) ($P < 0,05$). Entre estos dos últimos, el tratamiento MG con $0,860 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ fue el más alto de todos ($P < 0,05$). (Figura 20).

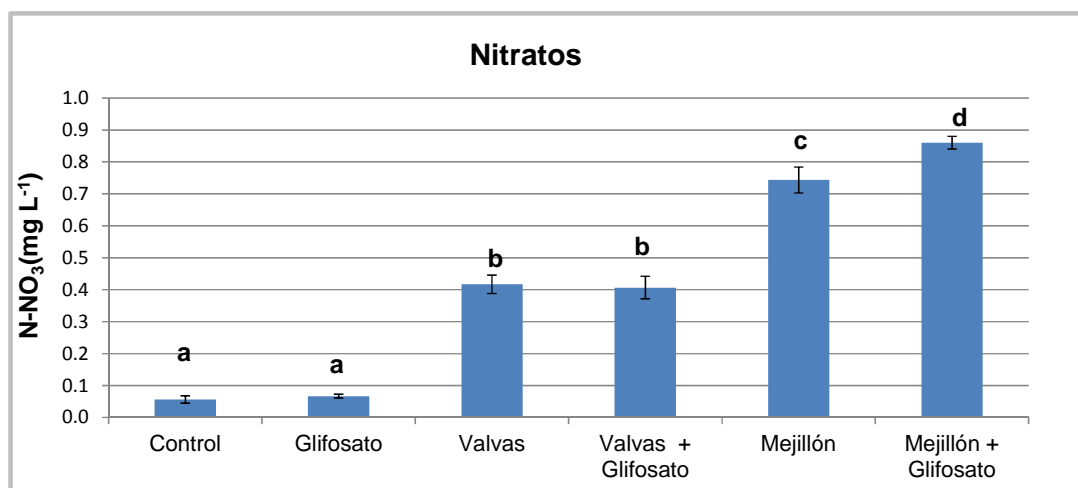


Figura 20. Valores medios de concentración de nitratos (N-NO₃ mg/l) en los distintos tratamientos al tiempo final del experimento. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Kruskal-Wallis ANOVA $P < 0,05$). Las barras de error representan desvío estándar.

Amonio (N-NH₄)

En lo que respecta al amonio (N-NH₄), al inicio de la experiencia no se detectaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Por su parte, para el tiempo final, se observó diferencia significativa entre la concentración de N-NH₄ en el tratamiento Mejillón+Glifosato con respecto a los

demás tratamientos, el cual mostró un notable aumento ($0,093 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$) (Test de Tukey P 0,05), con respecto al tiempo inicial y a los demás tratamientos. (Figura 21).

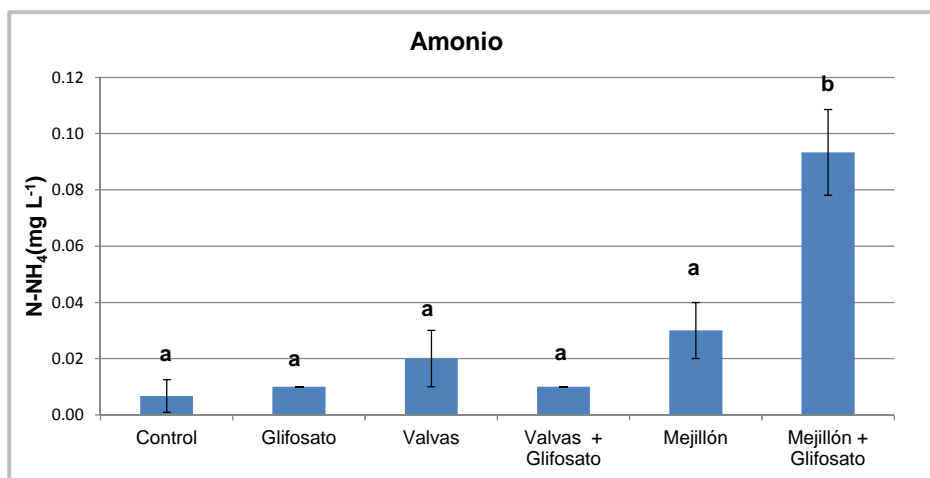


Figura 21. Valores medios de concentración de amonio (N-NH_4) en los distintos tratamientos al tiempo final del experimento. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Kruskal-Wallis ANOVA $P < 0.05$). Las barras de error representan desvío estándar.

Supervivencia de los mejillones al cabo de la experiencia

Durante los 7 días del experimento no se registró mortandad de los organismos de *Limnoperna fortunei*. Todos los organismos sobrevivieron, tanto los que fueron expuestos al glifosato como los que se mantuvieron en agua limpia, libre del herbicida.

Cuantificación e identificación de grupos de bacterias presentes en el biofilm de Limnoperna fortunei

Los resultados de la eficiencia de hibridación de las bacterias mediante la técnica CARD FISH con la sonda general Eubacterias (EUB 338-I-III), con respecto a las bacterias totales contadas con DAPI se muestra en la tabla 3. El porcentaje de hibridación varió entre un 84% (tratamiento Valva+glifosato) y un 64% (tratamientos valvas), considerando los distintos tratamientos.

Tabla 3. Porcentaje de hibridación de la sonda Eubacterias (EUB 338-I-III), respecto al total de bacterias teñidas con DAPI.

Tratamiento	% Hibridación de Eubacterias
Tiempo inicial	82%
Mejillón	78%
Valvas	64%
Mejillón+Glifosato	75%
Valva+ Glifosato	84%

Composición de bacterias al inicio de la experiencia

La densidad media de bacterias hibridadas al comienzo de la experiencia fue de $6,602 \times 10^8 \pm 4,08 \times 10^7$ bacterias cm^{-2} . El grupo más abundante fue el de las Alfaproteobacterias (53,4%), seguido por las Betaproteobacterias con el 15,8% y las Gamaproteobacterias con el 12,1%, mientras que el grupo con menor porcentaje fue Bacteroidetes con un 6,9%(Figura 22).

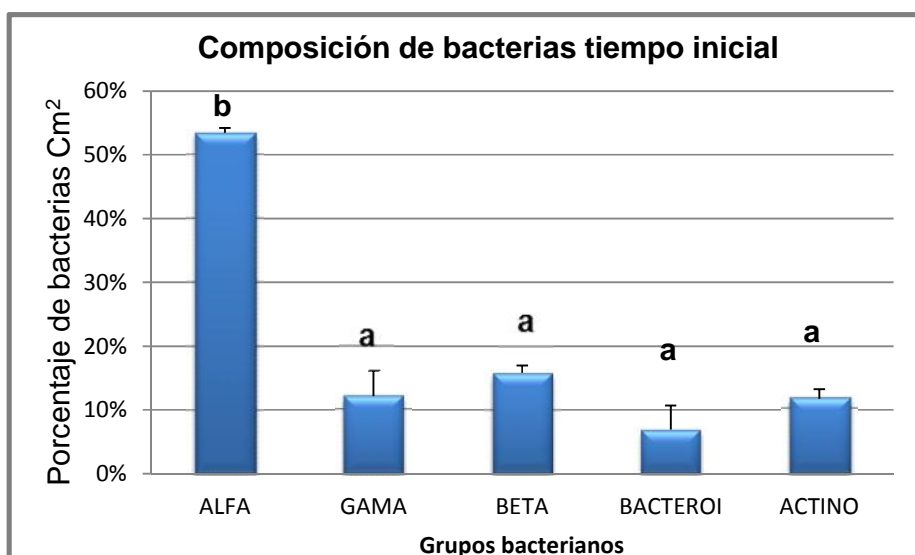


Figura 22. Valores promedio de la composición porcentual de los grupos de bacterias hibridadas, Alfaproteobacterias (ALFA), Gamaproteobacterias (GAMA), Betaproteobacterias (BETA), Bacteroidetes (BACTEROI) y Actinobacterias (ACTINO), al comienzo de la experiencia. Las letras diferentes indican diferencias significativas

entre los grupos bacterianos (Test de Tukey $P < 0,05$). Las barras de error representan el desvío estándar.

Composición de las bacterias al tiempo final

Eubacterias

Las Eubacterias (Eub 338-II-III) incluyen todos los grupos de sondas hibridados. En la figura 23 se representa el crecimiento de Eubacterias con respecto al tiempo inicial en cada uno de los tratamientos. El mayor crecimiento de bacterias corresponde al tratamiento Mejillón ($2,504 \times 10^8 \pm 6,442 \times 10^7$ células cm^{-2}), seguido por MG ($9,393 \times 10^7 \pm 3,334 \times 10^7$ células cm^{-2}) y VG ($8,574 \times 10^7 \pm 5,557 \times 10^7$ células cm^{-2}). El menor crecimiento se registró en el tratamiento V ($8,324 \times 10^7 \pm 9,723 \times 10^7$ células cm^{-2}). Sin embargo las diferencias encontradas entre los tratamientos no fueron estadísticamente significativas (Test de Tukey $P > 0,05$).

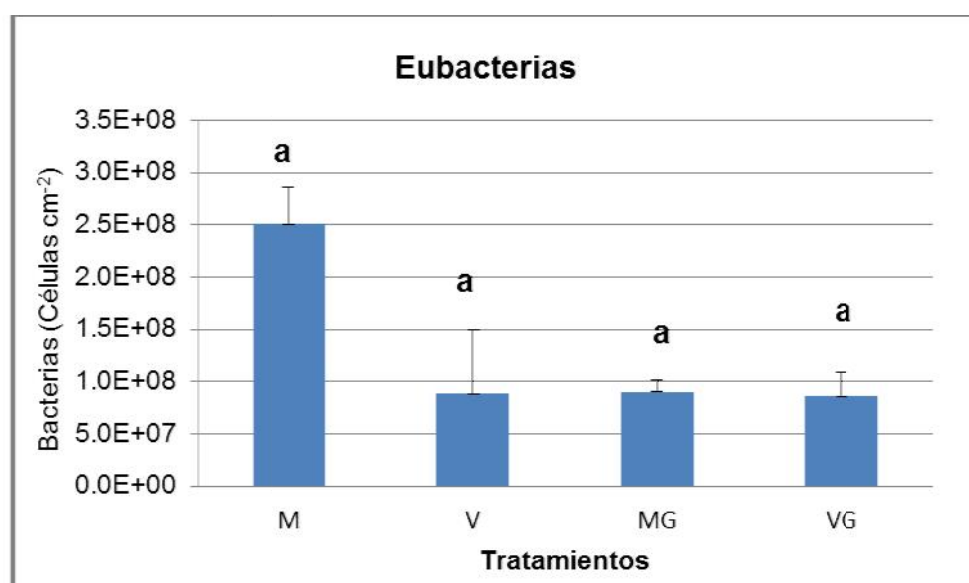


Figura 23. Valores promedio de Crecimiento de Eubacterias (células cm^{-2}) al final de la experiencia en los distintos tratamientos: Mejillón (M), Valvas (V), Mejillón+glifosato (MG) y Valva+glifosato (VG). Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey $P > 0,05$). Las barras de error representan desvío estándar.

Alfaproteobacterias

En la figura 24 se presenta el crecimiento en la abundancia de Alfaproteobacterias con respecto al tiempo inicial en cada uno de los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$). Se observa un mayor crecimiento en el tratamiento Mejillón ($1,533 \times 10^8 \pm 2,154 \times 10^7$ células cm^{-2}), seguido por Mejillón+glifosato ($6,721 \times 10^7 \pm 3,524 \times 10^7$ células cm^{-2}) y valva ($5,134 \times 10^7 \pm 6,688 \times 10^7$ células cm^{-2}). El menor crecimiento de este grupo se dio en el tratamiento valva+glifosato (VG: $7,165 \times 10^6 \pm 5,862 \times 10^7$ células cm^{-2}).

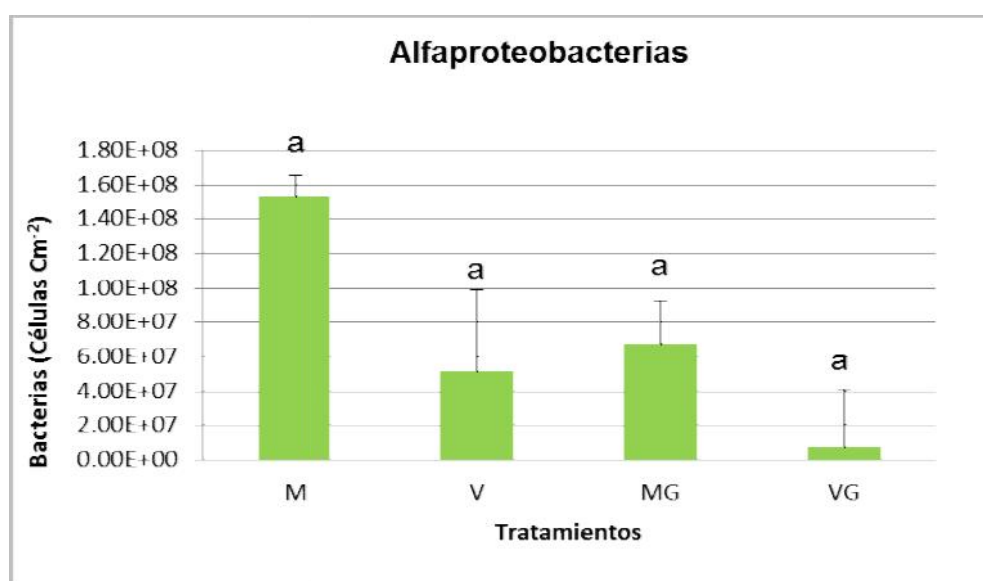


Figura 24. Valores promedio de crecimiento de Alfaproteobacterias (células cm^{-2}) al final de la experiencia en los distintos tratamientos: Mejillón (M), Valvas (V), Mejillón+glifosato (MG) y Valva+glifosato (VG). Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey $P > 0,05$). Las barras de error representan desvío estándar.

Betaproteobacterias

Para el grupo Betaproteobacterias, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$). En la figura 25, se muestra el crecimiento en la abundancia de este grupo de bacterias con respecto al tiempo inicial de la experiencia. Se puede observar que los mayores

crecimientos se dieron en los grupos sin glifosato: Mejillón ($7,849 \times 10^7 \pm 4,707 \times 10^7$ células cm^{-2}) y valva ($8,354 \times 10^7 \pm 1,149 \times 10^8$ células cm^{-2}), mientras que los menores crecimientos se registraron en los tratamientos con herbicida: (MG: $5,928 \times 10^6 \pm 1,029 \times 10^6$ bacterias cm^{-2} y VG: $5,233 \times 10^7 \pm 2,622 \times 10^7$ células cm^{-2}).

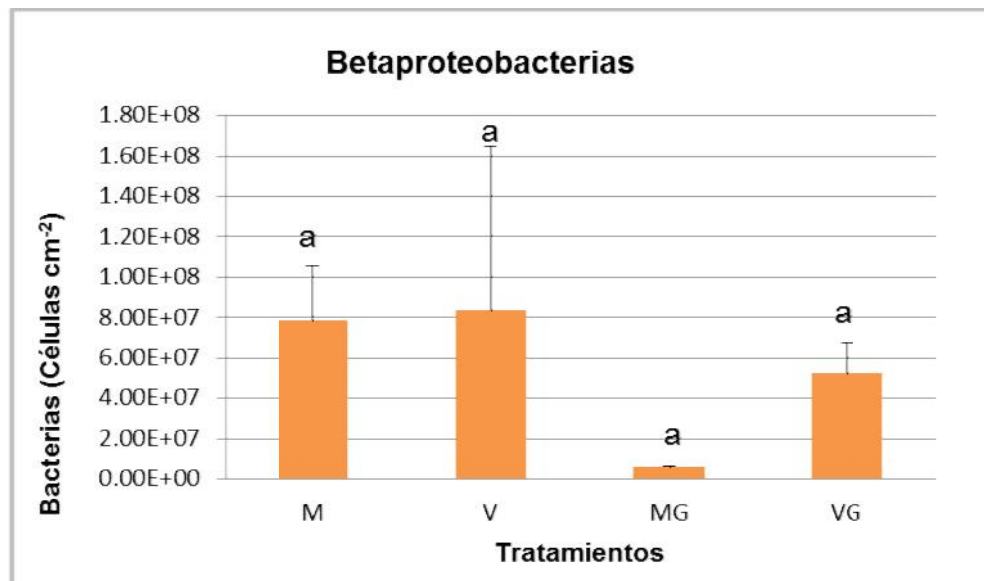


Figura 25. Valores promedio de crecimiento de Betaproteobacterias (células cm^{-2}) al final de la experiencia en los distintos tratamientos: Mejillón (M), Valvas (V), Mejillón+glifosato (MG) y Valva+glifosato (VG). Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey $P > 0,05$). Las barras de error representan desvío estándar.

Gamaproteobacterias

En la figura 26 se representa el crecimiento en la abundancia de Gamaproteobacterias con respecto al tiempo inicial en cada uno de los tratamientos. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento Valva (V) y los demás tratamientos (M, VG, MG), siendo éste (V) el que mostró el menor crecimiento: $1,49 \times 10^7 \pm 5,14 \times 10^5$ bacterias cm^{-2} , seguido por Mejillón+glifosato ($4,03 \times 10^7 \pm 1,47 \times 10^7$ bacterias cm^{-2}) y Mejillón ($4,75 \times 10^7 \pm 5,58 \times 10^6$ bacterias cm^{-2}). Por su parte, el tratamiento

Valva+glifosato (VG), fue el que presentó el mayor crecimiento ($5,94 \times 10^7 \pm 9,86 \times 10^6$ bacterias cm^{-2}).

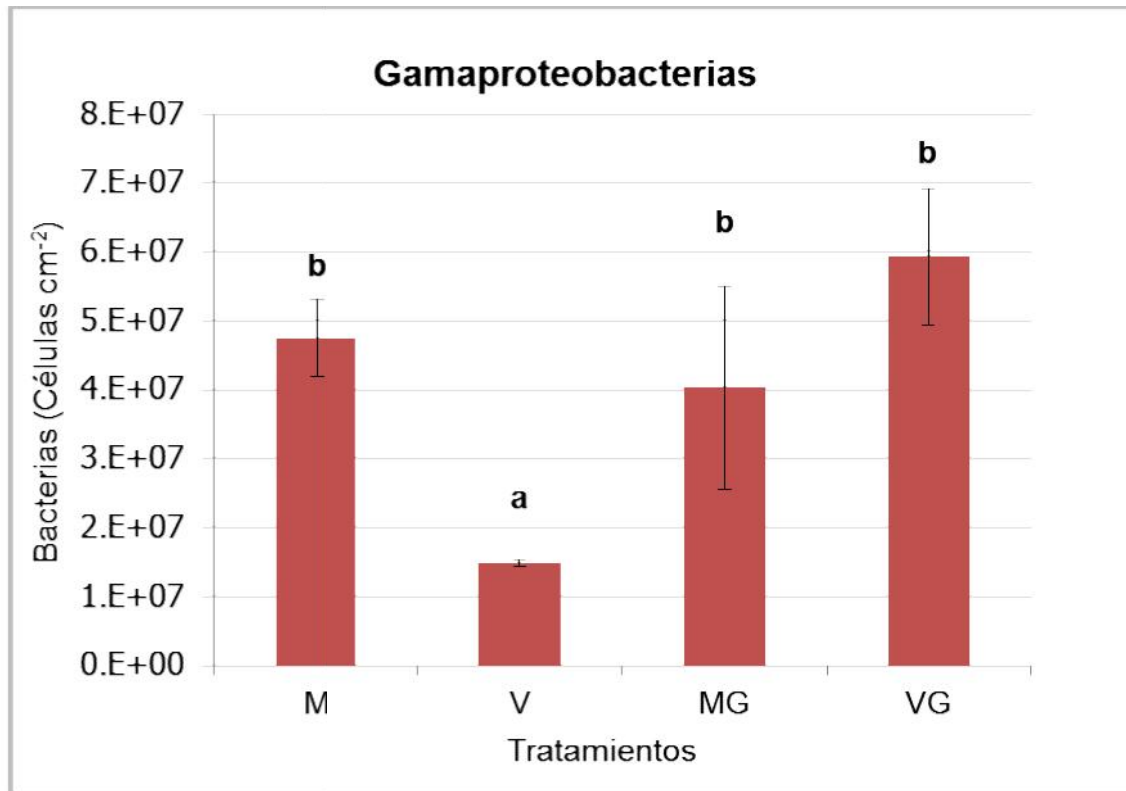


Figura 26. Valores promedio de crecimiento de Gamaproteobacterias (células cm^{-2}) al final de la experiencia en los distintos tratamientos: Mejillón (M), Valvas (V), Mejillón+glifosato (MG) y Valva+glifosato (VG). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Tukey $P < 0,05$). Las barras de error representan desvío estándar.

Bacteroidetes

Para el grupo Bacteroidetes no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$). En la figura 27, se muestra el crecimiento de este grupo de bacterias en los distintos tratamientos. Se puede observar que el mayor crecimiento se presentó en el tratamiento valvas ($V: 3,841 \times 10^7 \pm 2,290 \times 10^7$ células cm^{-2}) y el menor crecimiento en el tratamiento Mejillón+Glifosato: ($MG: 1,426 \times 10^7 \pm 1,893 \times 10^7$ células cm^{-2}), seguido por Mejillón ($2,404 \times 10^7 \pm 1,405 \times 10^7$ células cm^{-2}) y Valva+Glifosato ($2,559 \times 10^7 \pm 6,508 \times 10^6$ células cm^{-2}).

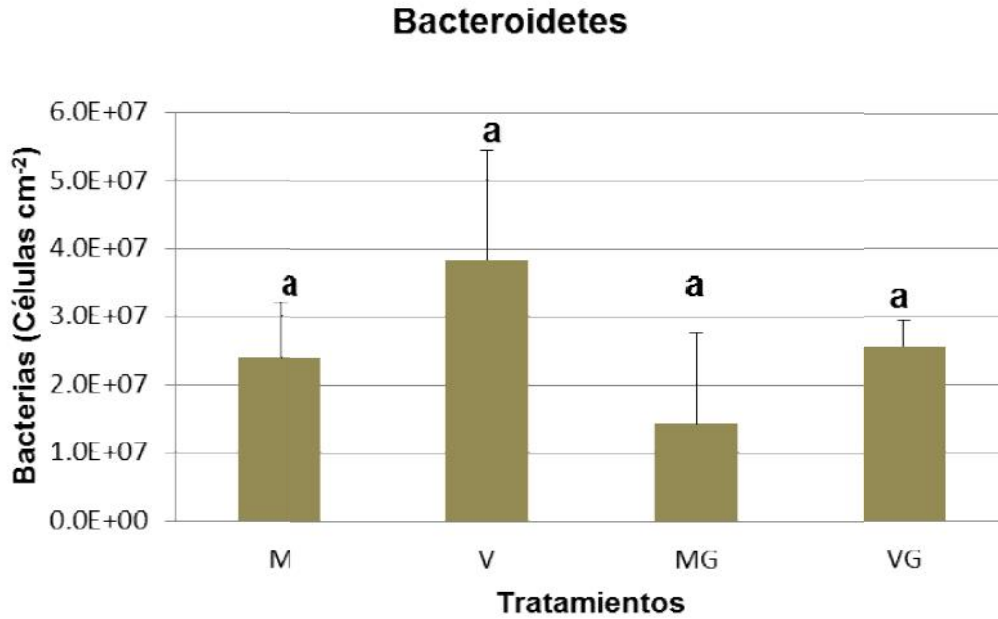


Figura 27. Valores promedio de crecimiento de Bacteroidetes (células cm⁻²) al final de la experiencia en los distintos tratamientos: Mejillón (M), Valvas (V), Mejillón+glifosato (MG) y Valva+glifosato (VG). Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey P> 0,05). Las barras de error representan desvío estándar.

Actinobacterias

En la figura 28 se representa el crecimiento en la abundancia de Actinobacterias con respecto al tiempo inicial en cada uno de los tratamientos. Se encontraron diferencias significativas (P<0,05) entre el tratamiento Valva (V) y los demás tratamientos (MG, M, VG), siendo V el que mostró el mayor crecimiento: $7,267 \times 10^7 \pm 3,543 \times 10^6$ células cm⁻². Por su parte el menor crecimiento se registró en el tratamiento Mejillón+glifosato ($1,772 \times 10^6 \pm 2,503 \times 10^7$ células cm⁻²), seguido por Mejillón ($1,785 \times 10^7 \pm 8,595 \times 10^6$ células cm⁻²) y Valva+glifosato ($2,570 \times 10^7 \pm 1,641 \times 10^7$ células cm⁻²).

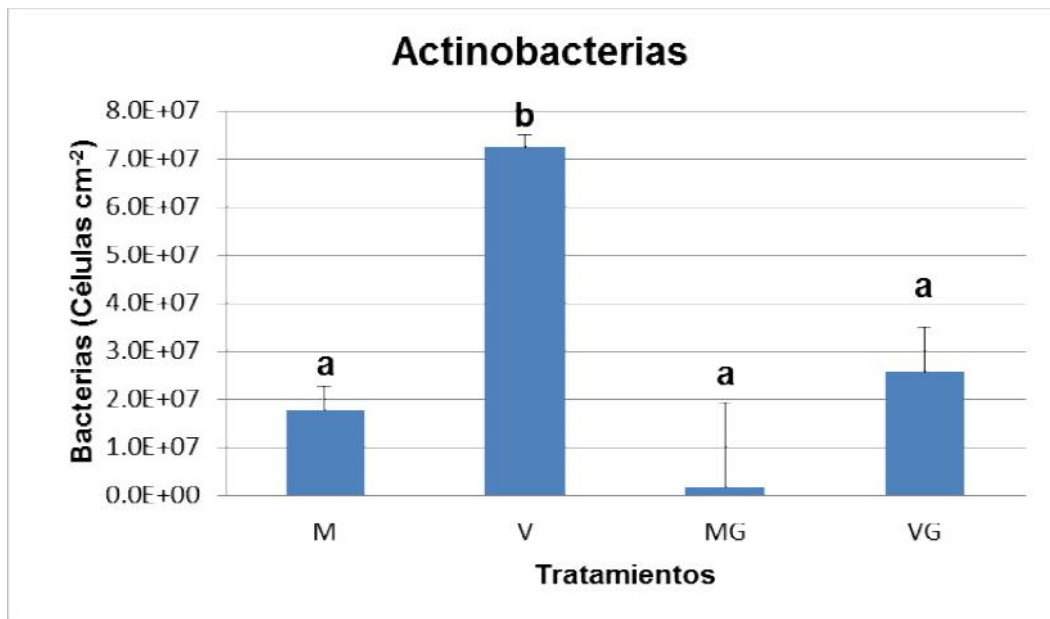


Figura 28. Valores promedio de crecimiento de Actinobacterias (células cm⁻²) al final de la experiencia en los distintos tratamientos: Mejillón (M), Valvas (V), Mejillón+glifosato (MG) y Valva+glifosato (VG). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Tukey P< 0,05). Las barras de error representan desvío estándar.

Análisis de Componentes principales

Los resultados del Análisis de Componentes Principales (PCA) basados en las variables de la abundancia de grupos de bacterias se muestran en la Figura 29. Los dos primeros ejes de este análisis explicaron el 83,8 % de la variabilidad total (eje 1: 59,3 %; eje 2: 24,5 %). El primer eje mostró una correlación directa con Actinobacterias (0,54), Bacteroidetes (0,54), y Betaproteobacterias (0,51) e inversa con Gamaproteobacterias (-0,39). Por su parte, el segundo eje se correlacionó directamente con Alfaproteobacterias (0,82) y Betaproteobacterias (0,38) e inversamente con Actinobacterias (-0,32).

El biplot (ejes 1 y 2) entre los tratamientos (C, M, V, MG y VG) y los grupos bacterianos muestra que el tratamiento que contenía solo valvas de mejillón (V) se ordenó en la parte derecha de la figura (próximo al centro de los cuadrantes superiores e inferiores), hacia valores menores de Gamaproteobacterias y mayores de Betaproteobacterias, Bacteroidetes y

Actinobacterias. Opuestamente, los tratamientos que contenían la presencia conjunta del herbicida glifosato con valvas o mejillones enteros (VG o MG respectivamente) se ubicaron en el cuadrante inferior izquierdo de la figura, hacia valores crecientes de Gamaproteobacterias y menor proporción de Betaproteobacterias, Bacteroidetes y Actinobacterias, siendo esta tendencia más marcada en MG que en VG. El tratamiento que sólo contenía mejillones enteros (M) se ordenó la parte superior de la gráfica, hacia valores crecientes de Alfaproteobacterias y en menor medida de Gama y Betaproteobacterias.

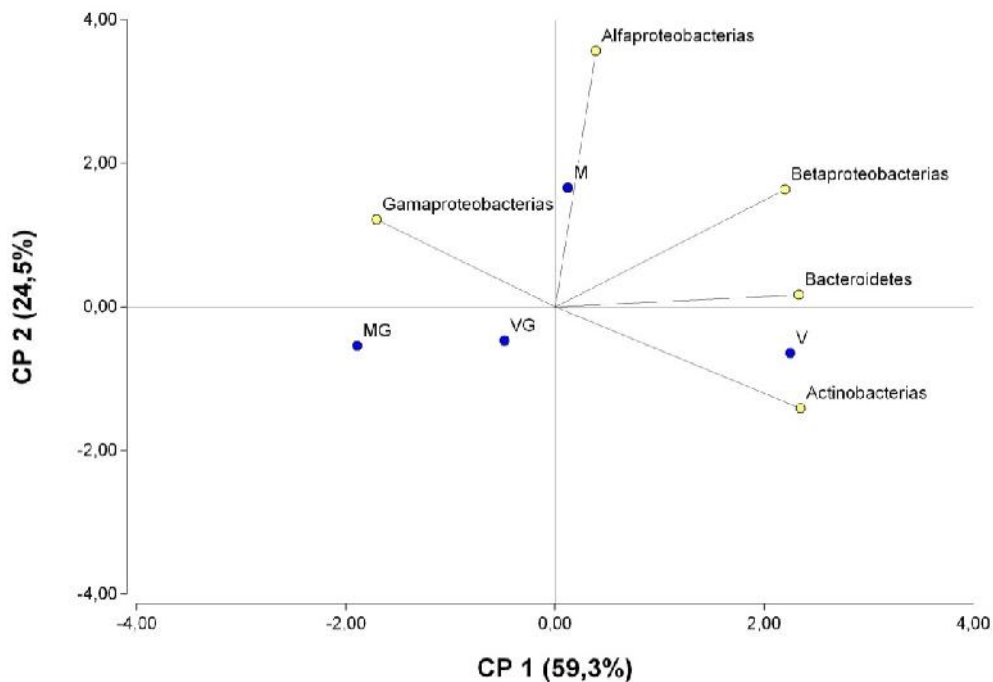


Figura 29. Análisis de Componentes Principales (PCA), para el ordenamiento de los tratamientos (C, M, V, MG y VG) utilizando como variable los grupos de bacterias. Los dos primeros ejes (CP 1 y CP 2) explican el 83,8% de la variabilidad total. El eje 1 (CP 1) representa un 59,3% de la variabilidad, y el eje 2 (CP 2) el 24,5%. En el biplot se observa el ordenamiento de los tratamientos de acuerdo a las abundancias de los diferentes grupos de bacterias.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

La significativa reducción de la concentración del glifosato en presencia de *Limnoperna fortunei* (MG=57±5%) y de sus valvas: (VG= 50±5%), conjuntamente con el aumento significativo en la concentración de ácido aminometilfosfónico (AMPA: VG=3,7±0,153 mg L⁻¹ y MG=2,7±0,115 mg L⁻¹) con respecto a los demás tratamientos, sugieren la intervención de *Limnoperna fortunei* y de las bacterias presentes en el biofilm de sus valvas en la disipación de glifosato. El AMPA es un metabolito que se produce en la ruta principal de degradación de glifosato y que luego puede ser degradado a dióxido de carbono y fósforo inorgánico (Franz *et al.*, 1997). Esta ruta de degradación ha sido citada como el principal mecanismo de remoción de glifosato en agua, producto de la biodegradación bacteriana y/o la adsorción de partículas en suspensión o de los sedimentos (Carlisle y Trevors, 1988; Eberbach, 1998).

Si bien no hay estudios previos sobre la degradación de glifosato mediada por bacterias asociadas a *Limnoperna fortunei*, en trabajos anteriores se comprobó que el mejillón sí participa en el proceso de disipación (Di Fiori *et al.*, 2012). En este estudio, al exponer el mejillón a una concentración de 20 mg L⁻¹, se obtuvo una disminución del herbicida del 40 ± 2% con mejillones enteros y del 29 ± 5% con valvas solas, por lo cual se sugirió la posible participación bacteriana en este proceso.

El hecho de que la reducción de la concentración de glifosato obtenida en nuestro experimento en presencia del mejillón (MG) sea significativamente mayor comparada con la realizada por las valvas solas (VG) y que la producción de AMPA (ácido aminometilfosfónico) sea mayor en el tratamiento VG comparada con MG, estaría indicando que además de la vía de degradación con producción de AMPA mediada por el biofilm presente en las valvas, pueden estar actuando otros mecanismos de reducción del herbicida asociados posiblemente al metabolismo propio de *Limnoperna fortunei* o a la biota bacteriana presente en su cavidad paleal y/o del tracto digestivo.

También la vida media de glifosato obtenida en esta experiencia, (5,8 días para MG y 7,7 días para VG), sugiere la participación tanto del mejillón entero como de las bacterias presentes en el biofilm de sus valvas en el proceso de disipación del herbicida y que este proceso lo realiza más rápidamente el mejillón entero. Estos valores se encuentran dentro de los valores citados en la literatura. En particular, Vera (2011), registró valores de vida media de glifosato de 16,02 días en microcosmos donde se estudió el impacto del Glifosato Atanor® sobre las comunidades microbianas del agua y de 5,74 días en mesocosmos tratados con Roundup® con una dosis de 12 mg de ingrediente activo/L, lo que fue atribuido a las características del agua en la cual este proceso se hace más lento. En los estudios realizados por Di Fiori *et al.* (2012), la vida media calculada fue de $28,8 \pm 1,4$ días para mejillones enteros y $33,8 \pm 1,5$ días para tratamientos con valvas solas, partiendo de una concentración de glifosato igual a la empleada en este estudio (20 mg L^{-1}).

Por su parte, también la tasa de disipación del glifosato obtenida en nuestro caso fue mayor para el tratamiento mejillón + glifosato: $4,26 \pm 0,56 \text{ mg glifosato/PS}^*\text{día}$, comparado con el tratamiento Valva + Glifosato (VG): $3,48 \pm 0,13 \text{ mg glifosato/PS}^*\text{día}$. La vida media y la tasa de disipación obtenidas, estarían indicando nuevamente que además de la disipación que realizan las bacterias presentes en el biofilm de las valvas de *Limnoperna fortunei*, puede haber reducción del glifosato por otras vías.

Con todo lo mencionado hasta aquí, estaríamos respondiendo a la primera hipótesis planteada para esta investigación: “El efecto del mejillón sobre la concentración del glifosato en agua es diferente respecto de sus valvas solas”. Como ya se explicó, en presencia de mejillón entero ocurre una mayor disminución de glifosato comparada con la que ocurre en valvas solas y esto va acompañado del aumento de AMPA, así como de las diferencias en las tasas de disipación y vida media de glifosato calculadas. De igual forma, también estamos corroborando la segunda hipótesis planteada que dice “Las bacterias presentes en el biofilm de las valvas del mejillón tienen la capacidad de degradar el herbicida glifosato”, ya que el glifosato presente en el agua disminuyó tanto en presencia de mejillón entero como en presencia de sus

valvas solas; de esta manera, se podría atribuir esta acción degradadora a las bacterias presentes en el biofilm de *Limnoperna fortunei*. Esta acción bacteriana se discutirá más adelante nuevamente.

Por su parte, el aumento significativo en la concentración de fosfatos, nitratos y amonio en el tratamiento Mejillón + Glifosato (MG) respecto de los demás tratamientos, estaría reflejando el aporte de estos al medio como resultado del proceso de disipación del glifosato por parte de *Limnoperna fortunei* y por la acción degradadora de las bacterias asociadas a su biofilm.

En cuanto a los fosfatos (Figura 19), el aumento significativo en su concentración en el tratamiento MG a tiempo final de la experiencia, sugiere la ruptura del enlace C-P y su consecuente liberación de fosfatos al medio (Castro *et al.*, 2007; Kononova y Nesmeyanova, 2002), propia de la disminución de glifosato realizada por *Limnoperna fortunei* y de las bacterias asociadas a su biofilm. Dicha actividad bacteriana es evidente ya que también se dio un aumento de fosfatos en el tratamiento Valva + Glifosato (VG) el cual, aunque no fue estadísticamente significativo, estaría indicando la acción degradadora de bacterias asociadas al biofilm del mejillón, las cuales excretan este nutriente al medio. El aumento de fosfatos en el tratamiento Mejillón (M) correspondería a la actividad metabólica propia de *Limnoperna fortunei*, que en condiciones de baja de nutrientes en el medio recurre a fuentes propias para compensar y mantener su metabolismo basal, tal como se demostró en estudios previos en los cuales en presencia de *Limnoperna fortunei* los valores de fosfatos también se vieron incrementados (Cataldo *et al.*, 2012a).

De manera semejante a lo descripto para el fósforo, las mayores concentraciones de nitrógeno aportado tanto por el nitrato (Figura 20) como el amonio (Figura 21), en presencia conjunta del mejillón y el herbicida son el producto de la ruta metabólica de degradación del glifosato en la que se obtiene AMPA y que finalmente es metabolizado a CO₂ y NH₄; en un medio bien oxigenado; el amonio es mayoritariamente transformado en nitrato; mientras que los niveles de este nutriente en presencia del mejillón solo, son debidos a la actividad del metabolismo basal de este organismo en el medio donde no

hay fuentes adicionales de nutrientes, de forma análoga a lo observado en estudios realizados en el embalse de la represa hidroeléctrica de Salto Grande donde *Limnoperna fortunei* incrementó los niveles de amonio en el agua (Cataldo *et al.*, 2012b).

La interacción *Limnoperna fortunei*-Glifosato puede repercutir sobre la disponibilidad de los nutrientes en el medio y esto puede traer aparejados cambios en la estructura y funcionalidad de los ecosistemas, dadas las interacciones complejas que se dan entre los organismos (Cataldo *et al.*, 2012 a, b; Kelly *et al.*, 2010; Boltovskoy *et al.*, 2013; Boltovskoy y Correa, 2015). Se ha observado que el fosforo es uno de los factores claves que ocasiona cambios en el fitoplancton y composición del perifiton de manera indirecta (Pérez *et al.*, 2007). El sistema mejillón dorado-bacterias degrada el herbicida glifosato, liberando nutrientes al medio, promueve la eutrofización de los ambientes acuáticos colonizados por esta especie, ya que los nutrientes quedan disponibles y pueden favorecer el desarrollo de algunas especies, como cianobacterias por ejemplo *Microcystis* sp., asociadas usualmente con eutrofización y con niveles elevados de la relación P: N (Cataldo *et al.*, 2012a).

Las bacterias constituyen una parte importante de las tramas tróficas de los cuerpos de agua y están involucradas en procesos de reciclado de nutrientes para los productores primarios. Las matrices propias de los biofilms permiten el almacenamiento de nutrientes y enzimas extracelulares que hidrolizan macromoléculas de compuestos orgánicos, dejándolas disponibles para ser incorporadas por las comunidades bacterianas (Pohlon *et al.*, 2009), determinando en parte la distribución de los grupos bacterianos que caracterizan los ambientes.

A través de la técnica CARD-FISH se pueden identificar los grupos bacterianos presentes en una muestra por medio de las hibridaciones realizadas con sondas conocidas de diferentes grupos. En esta tesis para estudiar los grupos bacterianos que forman parte del biofilm de las valvas de *Limnoperna fortunei* se utilizaron sondas conocidas correspondientes a los principales grupos bacterianos presentes en ecosistemas de agua dulce:

Eubacterias, Alfaproteobacterias, Betaproteobacterias, Gamaproteobacterias, Bacteroidetes y Actinobacterias.

La sonda Eubacterias (EUB I-II-III) permite hibridar la mayor parte de bacterias presentes en una muestra ya que abarca todos los grupos bacterianos analizados; por lo tanto el porcentaje de hibridación obtenido con esta sonda sirve como control de la eficiencia del proceso de la técnica CARD-FISH. Cabe señalar que este porcentaje de hibridación también depende de la cantidad de ribosomas presentes en las células blanco (Pernthaler *et al.*, 2002). En nuestro caso los porcentajes de hibridación con esta sonda, fueron del 82% para el tiempo inicial, y para el tiempo final varió entre 64% a un 84% para los distintos tratamientos (Tabla 3). Consideramos que los porcentajes de hibridación obtenidos permiten tener alta confiabilidad del proceso de hibridación realizado con la técnica al superar el 60% en todos los casos. Los porcentajes de hibridación son comparables a los obtenidos en otros estudios de bacterioperifiton realizados en lagunas de la pampa bonaerense con esta misma técnica (Sánchez., 2012; Sánchez *et al.*, 2015). También se obtuvieron porcentajes de hibridación similares en un estudio cuantitativo de bacterias y arqueas realizado en lagos patagónicos (Schiaffino 2012; Schiaffino *et al.*, 2015).

En cuanto a la composición bacteriana inicial (Figura 22), los valores obtenidos en este estudio para Alfaproteobacteria (53,4%) y Betaproteobacteria (15,8%), se encuentran comprendidos dentro del rango citados en ambientes de agua dulce. (Glöckner *et al.*, 1999, Zwisler *et al.*, 2003, Newton *et al.*, 2007), siendo estos dos grupos los de mayor abundancia. La dominancia de alfaproteobacterias observada en este estudio coincide con lo observado en lagunas pampeanas, donde este grupo también dominó la comunidad bacteriana (Sánchez, 2012; Sánchez *et al.*, 2015). En lagos patagónicos la comunidad estuvo dominada por alfaproteobacterias y betaproteobacterias (Schiaffino, 2012; Schiaffino *et al.*, 2015). Asimismo, resultados de un estudio realizado en tres secciones del Río de la Plata, muestran que en la zona límnic más cercana a la desembocadura del Río Uruguay los grupos bacterianos mejor representados corresponden a Alfaproteobacteria y

Betaproteobacteria (Bertoglio, 2012) y de igual manera, Alfaproteobacteria fue el grupo dominante de la comunidad del biofilm en un estudio realizado en sistemas fluviales en Italia (Lupini *et al.*, 2011).

Para el tiempo final del experimento se pudo ver que la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos incidió sobre la tasa de crecimiento y la composición específica del bacterioplancton, provocando entre los grupos bacterianos del biofilm, interacciones positivas y negativas relacionadas con su capacidad para asimilar los nutrientes disponibles en el medio (Atlas y Bartha, 2005), modificando así el crecimiento de estos grupos. Algunos de ellos, como las gamaproteobacterias y ciertos bacteroidetes prefieren altas concentraciones de nutrientes mientras que ciertas alfaproteobacterias se desarrollan mejor en medios con bajas concentraciones (Alonso y Pernthaler, 2006ab).

Al tiempo final de la experiencia realizada en esta tesis se observó crecimiento de todos los grupos de bacterias analizadas y un aumento significativo de los grupos bacterianos relacionados con la degradación de glifosato, tales como las gamaproteobacterias, en los tratamientos donde estaba presente este herbicida.

El grupo Gamaproteobacteria es el principal grupo citado en la literatura por su capacidad degradadora de glifosato y es conocido por su rápido crecimiento cuando se generan cambios ambientales en su medio (Pernthaler y Amann, 2005). En diferentes estudios en los que se han aislado bacterias del suelo en medios de cultivo enriquecidos con glifosato se ha encontrado que *Pseudomonas* sp de la clase Gamaproteobacteria, tiene la capacidad de utilizar el glifosato como fuente de fósforo rompiendo el enlace C-P. (Moore *et al.*, 1983 ; Jacob *et al.*, 1988 ; Liu *et al.*, 1991 ; Dick y Quinn, 1995a ; Martinez *et al.*, 2012). También de esta misma clase, *Enterobacter cloacae* K7, es mencionada por su capacidad de romper el enlace C-P y producir glicina a partir de glifosato en el suelo presente en cultivos de girasol (*Helianthus annuus* L.) y de sorgo (*Sorghum saccharatum* Pers) (Kryuchkova *et al.*, 2014). En cultivos de maíz (*Zea mays*) también se encontró que *Pseudomonas* sp.

tiene la capacidad de degradar glifosato en diferentes etapas de crecimiento de las plantas *in vitro* y también *in vivo* (Travaglia *et al.*, 2015).

Nuestros resultados mostraron que Valva + Glifosato (VG) fue el tratamiento en el que se dio mayor crecimiento de gamaproteobacterias (Figura 26), lo que estaría indicando la presencia de este grupo bacteriano en el biofilm de las valvas de *Limnoperna fortunei* y su participación en la degradación de glifosato en el agua. Esto coincide con el porcentaje de disminución de glifosato en este tratamiento que alcanzó un 50,22%, así como con la producción de AMPA y la excreción de nutrientes al medio explicados anteriormente.

Por su parte, el aumento de gamaproteobacterias en el tratamiento Mejillón, estaría indicando por una parte la posibilidad que el mejillón esté excretando al medio algún metabolito que permite o favorece el crecimiento de este grupo bacteriano sobre el biofilm, lo cual no ocurre en el caso del tratamiento valvas solas (V). Se ha encontrado que los miembros de las gamaproteobacterias tienen rápidas tasas de crecimiento en medios que están enriquecidos con nitrógeno y fósforo (Šimek *et al.*, 2006; Gasol *et al.*, 2002), por lo cual se podría hipotetizar que si *Limnoperna fortunei* con su metabolismo hace que estos nutrientes estén disponibles, esto podría repercutir en el aumento de este grupo bacteriano. Por otra parte, el crecimiento de este grupo en el tratamiento Mejillón también podría estar indicando la presencia de géneros de gamaproteobacterias que no están relacionados necesariamente con la degradación del glifosato, ya que la sonda de este grupo empleada en el ensayo incluye varios géneros y no todos son degradadores de glifosato. Estos resultados plantean la necesidad de realizar en el futuro hibridaciones con sondas específicas de géneros conocidos como degradadores de glifosato, tales como *Pseudomonas* sp., ampliamente citada en la bibliografía por su participación en este proceso.

En el caso VG (Valva + Glifosato), en el que se obtuvo el mayor crecimiento de gamaproteobacterias con respecto a los demás tratamientos, y significativamente diferente de V (valva sola), sería el glifosato el que estaría actuando como inductor de crecimiento para este grupo bacteriano. Para el

caso de MG que resultó menor que VG, aunque no significativamente diferente, pensamos que es posible que puedan ocurrir algunas relaciones de competencia bacteriana de las especies que se ven favorecidas por el metabolismo del mejillón y las que se ven favorecidas por el inductor glifosato. Se sabe que entre los microorganismos se dan relaciones de competencia directa por las mejores fuentes de alimento, es decir por los nutrientes disponibles y también que los productos metabólicos pueden acumularse favoreciendo procesos de inhibición en el crecimiento. (Atlas y Bartha, 2005). Sería interesante analizar en el futuro, estos procesos de interacción que no fueron el objeto de nuestro estudio.

El análisis de componentes principales realizado, en el cual se relacionaron todos los tratamientos (M, V, MG, VG) con los grupos bacterianos analizados (figura 29), mostró una clara correspondencia de los tratamientos con glifosato (VG y MG) con el crecimiento de Gamaproteobacteria y en menor proporción con Betaproteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria. Esta correspondencia que es más fuerte con Gamaproteobacteria en el caso del tratamiento Mejillón + Glifosato (MG) que en Valvas solas + glifosato (VG), estaría indicando que si bien las bacterias asociadas a las valvas de *Limnoperna fortunei* participan en el proceso de degradación, el metabolismo propio del mejillón o de las bacterias presentes en su cavidad paleal también pueden tener incidencia en este proceso de disipación haciéndolo más eficiente. El glifosato, al estar disponible en el medio, puede ser degradado por este grupo (Gamaproteobacteria), al romper el enlace C-P liberando fosfatos al medio.

Por su parte las valvas del mejillón en ausencia de glifosato (V), mostraron una mayor asociación con el crecimiento de Betaproteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria y menor con Gamaproteobacteria, lo que indica que este último grupo no se vio estimulado en su crecimiento en ausencia de glifosato.

Con respecto a la clase Betaproteobacteria, en nuestra experiencia no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos

tratamientos y observamos mayor crecimiento en los tratamientos sin glifosato (V, M). Algunas Betaproteobacteria han sido citadas por su capacidad degradadora de glifosato, como es el caso de *Burkholderia* sp. (Jacobsen y Hjelms, 2014); estos autores demostraron que esta especie aumentó significativamente en el suelo tratado con glifosato. Por su parte, Martínez *et al.*, 2012, también citan a *Burkholderia gladioli* como degradadora de glifosato (Roundup®) en el suelo. Sin embargo, en nuestro caso se podría pensar que el crecimiento de betaproteobacterias (Figura 25), no estuvo influenciado por la presencia o ausencia del glifosato o bien que pudo existir algún tipo de competencia por nutrientes entre los grupos bacterianos, resultando favorecidas en este proceso las gamaproteobacterias, ya que como se ha mencionado, tienen capacidad de competir por nutrientes y crecer bien en medios con altas concentraciones de nutrientes (Šimek *et al.*, 2006; Gasol J.M *et al.*, 2002).

En cuanto al grupo Actinobacteria, Forlani *et al.* (1999) citan al género *Streptomyces* sp. por su intervención en la degradación de glifosato. Arango *et al.* (2014), observaron que bacterias pertenecientes al grupo de Gemmatimonadetes de esta misma clase, aumentaron significativamente en suelos en los que se cultivó la soja transgénica resistente a glifosato. Sin embargo, en nuestro estudio, tampoco para este grupo se observó mayor crecimiento en los tratamientos con glifosato, siendo el tratamiento Valva (V) el que tuvo el mayor crecimiento y diferenciándose significativamente de los demás. (Figura 28).

En relación a los nutrientes y grupos bacterianos se puede concluir que el crecimiento de Gamaproteobacteria obtenido en este estudio puede estar relacionado directamente con la degradación del glifosato y que las bacterias de este grupo asociadas al biofilm de las valvas de *Limnoperna fortunei* participan en este proceso. Con esto estaríamos respondiendo afirmativamente a la tercera hipótesis planteada en esta tesis: “el glifosato ejerce un efecto sobre la estructura del biofilm bacteriano asociado a las valvas de *Limnoperna fortunei* y en presencia de glifosato se incrementa la abundancia de bacterias capaces de degradarlo”. De la misma manera, la cuarta hipótesis quedaría

respondida afirmativamente: “el metabolismo del molusco invasor, mediante la excreción de nutrientes tiene un efecto sobre la composición bacteriana” y que este efecto es la estimulación del crecimiento bacteriano de grupos degradadores del glifosato, como el caso de Gamaproteobacteria. Como se mencionó anteriormente, la presencia de nutrientes liberados al medio por parte de *Limnoperna fortunei* inciden en el crecimiento bacteriano induciendo al crecimiento de los grupos degradadores y en consecuencia cambiando la composición de los grupos bacterianos. En cuanto a la quinta hipótesis de este trabajo en la que se menciona que “la acción conjunta del herbicida y el molusco invasor tendrá un efecto diferencial respecto de cada uno de los factores por separado”; podemos mencionar que bajo las condiciones del experimento esta hipótesis parece no corroborarse ya que si bien los valores más altos de degradación del glifosato sí se dieron para el tratamiento MG, ambos factores actuando conjuntamente no tuvieron un efecto sinérgico sobre el crecimiento bacteriano pues en el tratamiento en ausencia de Mejillón (VG) fue donde se dio un mayor crecimiento de gamaproteobacterias y no en el que estaba presente el Mejillón entero (MG) (Figura 26). Estos resultados sugieren que el mejillón puede estar realizando la disipación del glifosato también por otras vías además de la degradación bacteriana en sus valvas.

Como se ha mencionado, sería interesante continuar estos estudios con experimentos en los que se usen sondas específicas de géneros para los grupos bacterianos que se asocian con el proceso de degradación. Por ejemplo para Gamaproteobacteria se podrían llevar a cabo hibridaciones con sondas del género *Pseudomonas*. Asimismo, sería interesante estudiar las bacterias internas del mejillón *Limnoperna fortunei*, tanto de la cavidad paleal como de su tracto digestivo, para establecer de qué manera o que grupos están participando en los procesos de degradación de glifosato. También sería conveniente hacer ensayos del crecimiento de estos grupos empleando glifosato Atanor® y Roundoup® que son los dos herbicidas de glifosato más utilizados en Argentina, a fin de dilucidar cómo es el comportamiento bacteriano con estos formulados y establecer si hay diferencias con el glifosato puro empleado por nosotros en este experimento.

Por otro lado, es importante mencionar que si bien *Limnoperna fortunei* participa en el proceso de disipación de este xenobiótico, el impacto de esta especie sobre los ecosistemas que invade es múltiple ya que ejerce un fuerte efecto sobre el fitoplancton (Boltovskoy *et al.*, 2009^a; Cataldo *et al.*, 2012a), el zooplancton (Rojas Molina y José de Paggi, 2008; Rojas Molina *et al.*, 2011; 2012), la fauna íctica (Paolucci *et al.*, 2007; 2010ab; Boltovskoy y Correa, 2015; Cataldo 2015), y la mineralización de nutrientes (Cataldo *et al.*, 2005a;2012a). Debido a su hábito epifaunal, que le permite fijarse a cualquier estructura dura, *Limnoperna fortunei* ocupa un nicho ecológico vacante en nuestros cuerpos de agua dulce, modificando radicalmente las superficies colonizadas. Estas modificaciones comprenden un aumento en la biomasa y composición de la fauna acompañante que se desarrolla dentro de sus colonias como también un aumento exponencial de la superficie disponible para el desarrollo del biofilm.

Podríamos afirmar que el aumento de la superficie disponible para el biofilm, sumado al suministro de nutrientes excretados por el metabolismo del mejillón, crean las condiciones necesarias para el desarrollo de bacterias capaces de degradar el herbicida glifosato en agua. Este estudio constituye un punto de partida para el estudio del componente bacteriano del biofilm presente en las valvas de *Limnoperna fortunei* y abre la posibilidad de pensar en este invasor como un aliado en la biodegradación del glifosato en los ambientes invadidos por el molusco. Sin embargo, tanto la presencia de *Limnoperna* como la del glifosato y su interacción parecen acelerar los procesos de eutrofización en los ecosistemas de agua dulce (Pérez *et al.*, 2007; Di Fiori *et al.*, 2012; Vera *et al.*, 2012; Cataldo *et al.*, 2015 a,b; Pizarro *et al.*, 2015b).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allgaier M., Grossart H. P. 2006. Diversity and seasonal dynamics of Actinobacteria populations in four lakes in northeastern Germany. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3489–3497.

Alonso C., Pernthaler J. 2006a. Roseobacter and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. *Environmental Microbiology* 8: 2022-20130.

Alonso C., Pernthaler J. 2006b. Concentration-dependent patterns of leucine incorporation in coastal picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2141-2147.

Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1919-1925.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.

Andersson S.G., Zomorodipour A., Andersson J.O., Siceritz-Pontén T., Alsmark U.C.M., Podowski R.M., Kurland C.G. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396 (6707): 133-140.

Annett R., Habibi H.R., Hontela A. 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology* 34(5): 458-479.

Aparicio V.C., De Gerónimo E., Marino D., Primost J., Carriquiriborde P., Costa J.L. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93:1866-1873.

Arango L., Buddrus-Schiemann K., Opelt K., Lueders T., Haesler F., Schmid M., Ernst D., Hartmann A. 2014. Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup Ready® soybean. *European Journal of Soil Biology* 63: 41-48.

Atlas R., Bartha R. 2005. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4° edición. Pearson educación S.A. Madrid. 637 pp.

Avigliano E., Schenone N.F. 2015. Human health risk assessment and environmental distribution of trace elements, glyphosate, fecal coliform and total coliform in Atlantic Rainforest mountain rivers (South America). *Microchemical Journal* 122: 149–158.

Avigliano L., Fassiano A.V., Medesani D.A., Ríos de Molina M.C., Rodríguez E.M. 2014. Effects of Glyphosate on Growth Rate, Metabolic Rate and Energy Reserves of Early Juvenile Crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 92:631–635.

Bakry F.A., Ismail S.M., Abd El-Atti M.S. 2015. Glyphosate herbicide induces genotoxic effect and physiological disturbances in *Bulinus truncatus* snails. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 123: 24–30.

Bampfylde C.J., Peters J.A., Bobeldyk A.M. 2010. A literature analysis of freshwater invasive species research: Are empiricists, theoreticians, and economists working together? *Biological Invasions* 12: 1207-1219.

Barja B.C., 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.

Bazot S y Lebeau T. 2008. Simultaneous mineralization of glyphosate and diuron by a consortium of three bacteria as free- and/or immobilized-cells formulations. *Applied microbiology and Biotechnology* 77(6): 1351-1358.

Berg K.A., Lyra C., Sivonen K., Paulin L., Suomalainen S., Tuomi P., Rapala J. 2009. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *The ISME Journal* 3(3): 314-325.

Bertoglio. 2012. Respuesta de la comunidad bacteriana a alteraciones de la trama trófica planctónica en el Río de la Plata. Tesina de grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de la República. Uruguay.

Boltovskoy D., Correa N. 2015. Ecosystem impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (golden mussel) in South America. *Hydrobiologia* 746:81–95.

Boltovskoy D., Correa N., Bordet F., Leites V., Cataldo D. 2013. Toxic *Microcystis* (cyanobacteria) inhibit recruitment of the bloom-enhancing invasive bivalve *Limnoperna fortunei*. *Freshwater Biology* 58:1968–1981.

Boltovskoy D., Correa N., Cataldo D., Sylvester F. 2006. Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Rio de la Plata watershed and beyond. *Biological Invasions* 8: 947-963.

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*: implications for antifouling strategies. *Austral Ecology* 34:719-730.

Boltovskoy D. 2015. *Limnoperna fortunei*. The Ecology, Distribution and Control of Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel. *Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology*. Series Editor Daniel Simberloff. Ecology and Evolutionary Biology Knoxville Tennessee. USA. 486 pp.

Boltovskoy, D., Cataldo, D. 1999: "Population dynamics of *Limnoperna fortunei*, an invasive fouling mollusc, in the lower Paraná river (Argentina)". *Biofouling* 14 (3): 255-263.

Bonnet J.L., Bonnemoy F., Dusser M., Bohatier J. 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(1): 78–91.

Borggaard O.K., Gimsing A.L. 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: A review. *Pest Management Science* 64(4): 441–456.

Bricheux G., Le Moal G., Henequin C., Coffe G., Donnadiou F., Portelli C., Bohatier J., Forestier C. 2012. Characterization and evolution of natural aquatic biofilm communities exposed in vitro to herbicides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88:126-134.

Brugnoli E., Clemente J., Boccardi L., Borthagaray A., Scarabino F. 2005. Golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) distribution in the main hydrographical basins of Uruguay: update and predictions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77:235–244.

Burlakova L.E., Karatayev A.Y., Karatayev V.A. 2012. Invasive mussels induce community changes by increasing habitat complexity. *Hydrobiologia* 685:121–134.

Carlisle S. M., Trevors J.T. 1988. Glyphosate in the environment. *Water, Air, and Soil Pollution* 39: 409–420.

Carter A. 2000. How pesticides get into water - and proposed reduction measures. *Pesticide Outlook* 11: 149–156.

CASAFE. 2013. Cámara de Sanidad, y Fertilizantes. Informe de Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios. 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. 2015. Larval Development of *Limnoperna fortunei*. En: Boltovskoy D. (Ed). *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Springer International Publishing, Cham (Switzerland). 43-53 pp.

Cataldo D., Boltovskoy D. 2000. Yearly reproductive activity of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia) as inferred from the occurrence of its larvae in the plankton of the lower Paraná River and the Río de la Plata estuary (Argentina). *Aquatic Ecology* 34:307–317.

Cataldo D., Boltovskoy D., Hermosa J., Canzi C. 2005a. Temperature-dependent rates of larval development in *Limnoperna fortunei* (bivalvia: mytilidae). *Journal of Molluscan Studies* Vol. 71, N°1.

Cataldo D., Sylvester F., Boltovskoy D. 2005b. El mejillón dorado: estudios experimentales (desarrollo larval y tasas de filtración). En: Penchaszadeh P.E. (Coord). *Invasores. Invertebrados bentónicos introducidos en el Río de la Plata y región costera marina aledaña*. EUDEBA. Buenos Aires. 103-132 pp.

Cataldo D., Boltovskoy D., Marini V., Correa N. 2002. Limitantes de la expansión de *Limnoperna fortunei* en la cuenca del Plata: la predación por peces. Terceras Jornadas sobre la Conservación de la Fauna Íctica del Río Uruguay, Paysandú, Uruguay. 25-26 pp.

Cataldo D., Vinocur A., O´Farell I., Paulocci 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.

Cataldo D., O' Farrell I., Paulocci E., Sylvester F., Boltovskoy D. 2012b. Impact of the invasive golden mussel (*Limnoperna fortunei*) on phytoplankton and nutrient cycling. *Aquatic invasions* 7:91-100.

Cattaneo R., Clasen B., Loro V.L., de Menezes C.C., Pretto A., Baldisserotto B., Santi A., de Avila L.A. 2011. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87(6): 597–602.

Cavalcante D., Martínez C.B.R., Sofia S.H. 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 655(1-2): 41–46.

Cavas T., Konen S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22(4): 263–268.

CCM International. 2011. Outlook for China Glyphosate Industry 2012-2016.

Cole J.J., Findlay S., Pace M.L. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross overview. *Marine Ecology Progress Series* 43: 1-10.

Contardo-Jara V., Klingelmann E., Wiegand C. 2009. 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.

Corno G., Modenutti B.E., Callieri C., Balseiro E.G., Bertoni R., Caravatia E. 2009. Bacterial diversity and morphology in deep ultraoligotrophic Andean lakes: the role of UVR on vertical distribution. *Limnology and Oceanography* 54(4): 1098-1112.

Correa N., Sardiña P., Perepelizin P., Boltovskoy D. 2015. *Limnoperna fortunei* Colonies: Structure, Distribution and Dynamics. En: Simberloff D (Editor). The Ecology, Distribution and Control of Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel. Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology. Ecology and Evolutionary Biology Knoxville Tennessee. USA.

Costerton J., Lewandowski D.E., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G. 1994. Biofilms: The customized microniche. *Journal of Bacteriology* 176: 2137-2147.

Cotner, J. B., Biddanda B.A. 2002. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5:105–121.

Cox C. 1995. Glyphosate Part 1: Toxicology. *Journal of Pesticide Reform* 15: 14–20.

Cuervo J. 2007. Interacción del glifosato (Roundup®) con la biota microbiana del suelo y comportamiento de este herbicida en tres suelos del Tolima-Colombia, bajo condiciones controladas. Tesis de Maestría en Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia.

Daims H., Bruhl A., Amann R., Schleifer K.H., Wagner M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* 22: 434-444.

Darrigran G., Damborenea M.C. 2006a. Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano. Universidad Nacional de la Plata. Editorial de la Universidad de la Plata. 59 pp.

Darrigran G., Damborenea M.C. 2006b. Aspectos generales vinculados a la prevención y control. En: Darrigran G., Damborenea MC (Edit). Bio-invasión del

mejillón dorado en el continente americano. La Plata, Argentina: EDULP. 153-155 pp.

Darrigran, G., Deher M.C. 2006. Distribución, abundancia y dispersión. En: Darrigran y Damborenea (Editores). Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano. Universidad Nacional de la Plata. Editorial de la Universidad de la Plata. Pg 107.

Darrigran G. 2002. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biological Invasions* 4: 145-156.

Darrigran G., Ezcurra de Drago I. 2000a. Distribución de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) en la Cuenca del Plata, Región Neotropical. *Medio Ambiente* 13 (2):75-79.

Darrigran G., Ezcurra de Drago I. 2000b. Invasion of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in America. *Nautilus* 2:69-74.

Darrigran G., Martin SM., Gullo B., Armendariz L. 1998. Macroinvertebrates associated with *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) in Río de la Plata, Argentina. *Hydrobiology* 367: 223-230.

Darrigran G., Pastorino G. 1993. Bivalvos invasores en el Río de la Plata, Argentina. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica de Uruguay* 7: 309-313.

Darrigran G.A., Boeger W., Damborenea C., Maroñas M. 2009. Evaluation of sampling and analysis techniques for early detection of *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) in limit areas of its distribution. *Brazilian Journal of Biology* 69:979–980.

Darrigran G.A., Damborenea C., Drago E.C., Ezcurra de Drago I., Paira A. 2011. Environmental factors restrict the invasion process of *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) in the Neotropical region: A case study from the Andean tributaries. *Annales de Limnologie–International Journal of Limnology* 47:221–229.

Darrigran G.A. 1995. *Limnoperna fortunei*, ¿un problema para los sistemas naturales de agua dulce del Mercosur? *Museo* 1 (5): 85-87.

De Wever A., Muylaert K., Van der Gucht K., Pirlot S., Cocquyt C., Descy J.P., Vyverman W. 2005. Bacterial community composition in Lake Tanganyika: vertical and horizontal heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 5029-5037.

De Wever A., Van der Gucht K., Muylaert K., Cousin S., Vyverman W. 2008. Clone library analysis reveals an unusual composition and strong habitat partitioning of pelagic bacterial communities in Lake Tanganyika. *Aquatic Microbial Ecology* 50:113–122.

Debroas D., Humbert J.F., Enault F., Bronner G., Faubladiet M., Cornillot E. 2009. Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget-France). *Environmental Microbiology* 11:2412–2424.

Denisova L.Y., Bel'kova N. L., Tulokhonov I.I., Zaichikov E. F. 1999. Bacterial diversity at various depths in the southern part of Lake Baikal as revealed by 16S rDNA sequencing. *Microbiology* 68:475–483.

Denyer S., Gorman S.P., Sussman M (eds). 1993. *Microbial Biofilms: Formation and Control*. Blackwell. Oxford. Gran Bretaña.

Dick R.E., Quinn J.P. 1995a. Control of Glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW. *FEMS Microbiology Letters* 134: 177-182.

Dick R.E., Quinn J.P. 1995b. Glyphosate-degrading isolates from environmental-samples -occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43(3): 545–550.

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.

Druart C., Millet M., Scheifler R., Delhomme O., de Vaufleury A. 2011. Glyphosate and glufosinate-based herbicides: Fate in soil, transfer to, and effects on land snails. *Journal of Soils and Sediments* 11(8): 1373–1384.

Eberbach P. 1998. Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (N-(phosphonomethyl) glycine) in four soils. *Pesticide Science* 52: 229–240.

Eiler A., Bertilsson S. 2007. Flavobacteria blooms in four eutrophic lakes: linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology* 73:3511–3518.

Fagundes de Freitas S.M., Kapusta S.C., Würdig N.L. 2009. Invertebrados bentônicos das lagoas da planície costeira do Rio Grande do Sul. In: Würdig NL, Freitas SMF (eds). *Ecosistemas e biodiversidade do litoral norte do RS*. Editora Nova Prova, Porto Alegre, pp 120–141.

Feng J.C., Thompson D.G, Reynolds P. 1990. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. Aquatic residues and off-target deposit assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38:1110–1118.

Folmar L.C., Sanders H.O., Julin A.M., 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 8: 269–278.

Forlani G., Mangiagalli A., Nielsen E., Suardi C.M. 1999. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 991-997.

Franz J.E., Mao M.K., Sikorski J.A. 1997. Glyphosate. A unique global herbicide. *American Chemistry Society, ASC Monographs* 189: 1-600.

García M.L., Montalto L. 2006. Los peces depredadores de *Limnoperna fortunei* en los ambientes colonizados. En: Darrigran G., Damborenea C (eds) *Bio-*

invasión del mejillón dorado en el continente americano. La Plata, Argentina: EDULP 11-128 pp.

Gardner S.C., Grue C.E., Grassley J.M., Lenz L.A., Lindenauer J.M., Seeley M.E. 1997. Single species algal (*Ankistrodesmus*) toxicity tests with Rodeot and Garlont 3a. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 59: 492–499.

Gasol J.M., Comerma M., García J.C., Armengol J., Casamayor E.O., Kojecká P., Šimek K. 2002. A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon shaped reservoir. *Limnology and Oceanography* 47(1): 62-77.

Ghisi N.C., Cestari M.M. 2013. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term environmentally low concentration exposure. *Environmental Monitoring and Assessment* 185: 3201–3207.

Giesy J.P., Dobson S., Solomon K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167: 35–120.

Gilbert N. 2013. A hard look at GM crops. *Nature* 497: 24–26.

Glöckner F.O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler J., Pernthaler A., Amann R. 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66(11): 5053-5065.

Glöckner F.O., Fuchs B.M., Aman R. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3721-3726.

Glozier N.E., Struger J., Cessna A.J., Gledhill M., Rondeau M., Ernst W.R., Sekela M.A., Cagampan S.J., Sverko E., Murphy C., Murray J.L., Donald D.B.

2012. Occurrence of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and streams in Canada, 2007. *Environmental Science Pollution Research*. Int. 19: 821–834.

Gluszczak L., Loro V.L., Pretto A., Moraes B.S., Raabe A., Duarte M.F., da Fonseca M.B., de Menezes C.C., Valladao D.M.D. 2011. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 624–630.

Grisolia C.K., Starling F. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 491: 39–44.

Guilherme S., Gaivao I., Santos M.A., Pacheco M. 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® - a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis* 25: 523–530.

Hahn M.W., Kasalický V., Jezbera J., Brandt U., Jezberová J., Šimek K. 2010. *Limnohabitans curvus* gen. nov., sp. nov., a planktonic bacterium isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(6): 1358-1365.

Hahn M.W., Lünsdorf H., Wu Q., Schauer M., Höfle M.G., Boenigk J., Stadler P. 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied and Environmental Microbiology* 69(3):1442-1451.

Hahn M.W., Pöckl M. 2005. Ecotypes of planktonic Actinobacteria with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 71:766–773.

- Hallas L.E., Adams W.J., Heitkamp M.A. 1992. Glyphosate degradation by immobilized bacteria: field studies with industrial wastewater effluent. *Applied and environmental microbiology* 58(4): 1215-1219.
- Hartman W.A., Martin D.B. 1985. Effects of four agricultural pesticides on *Daphnia pulex*, *Lemna minor*, and *Potamogeton pectinatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 35:646–651.
- Hedberg D., Wallin M. 2010. Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicology in Vitro* 24: 795–802.
- Hietanen E., Linnainmaa K., Vainio H. 1983. Effects of phenoxyherbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 53: 103–112.
- Hiorns W.D., Methé B.A., Nierzwicki-Bauer S.A., Zehr J.P. 1997. Bacterial diversity in Adirondack Mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2957–2960.
- Howe C.M., Berrill M., Pauli B.D., Helbing C.C., Werry K., Veldhoen N. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North american frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(8): 1928–1938.
- Hued A.C., Oberhofer S., Bistoni M.D. 2012. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62(1): 107–117.
- Humbert J.F., Dorigo U., Cecchi P., Le Berre B., Debroas D., Bouvy M. 2009. Comparison of the structure and composition of bacterial communities from temperate and tropical freshwater ecosystems. *Environmental Microbiology* 11(9): 2339-2350.

Hutalle-Schmelzer K.M.L., Zwirnmann E., Krüger A., Grossart H.P. 2010. Enrichment and cultivation of pelagic bacteria from a humic lake using phenol and humic matter additions. *FEMS Microbiology Ecology* 72:58–73.

INTA. 2015. Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el Ambiente. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 1a ed. Balcarce, Buenos Aires, Famaillá, Tucumán, Reconquista, Santa Fe. Ediciones INTA. 73 pp.

Iwasaki K., Uryu Y. 1998. Life cycle of a freshwater Mytilid mussel, *Limnoperna fortunei*, in Uji River, Kyoto. *Venus* 57:105-113.

Jacob G.S., Garbow J.R., Hallas L.E., Kimack N.M., Ganesh M. Kishore G.M., Schaefer J. 1988. Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas* sp. Strain Lbr. *Applied And Environmental Microbiology* 2953-2958.

Jacobsen C.S., Hjelms M.H. 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 27:15–20.

Jiraungkoorskul W., Upatham E.S., Kruatrachue M., Sahaphong S., Vichasri-Grams S. 2002. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia* 28: 121–127.

Jiraungkoorskul W., Upatham E.S., 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(4): 260–267.

Karatayev A.Y., Boltovskoy D., Padilla D.K., Burlakova L.E. 2007a. The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasion impacts. *Journal of Shellfish Research* 26:205–213.

Karatayev A.Y., Padilla D.K., Minchin D., Boltovskoy D., Burlakova L.E. 2007b. Changes in global economies and trade: the potential spread of exotic freshwater bivalves. *Biological Invasions* 9:161-180.

Karatayev A.Y., Burlakova L.E., 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 A.Y., Burlakova L.E., Padilla D.K. 2002. Impacts of zebra mussels on aquatic communities and their role as ecosystem engineers. En: Leppäkoski E., Gollasch S., Olenin S (eds). *Invasive aquatic species of Europe: Distribution, impacts and management*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht. 433–446 pp.

Kawase M. 2011. Feeding and filtration in *Limnoperna lacustris*. http://www.mizuho-c.ac.jp/images/library/kiyo_05/amckiyo-no05-05.pdf. Accessed 11 Feb 2014.

Kelly D.W., Herborg L-M., Maclsaac H.J. 2010. Ecosystem changes associated with *Dreissena* invasions: recent developments and emerging issues. In: van der Velde G, Rajagopal S, bij de Vaate A (eds). *The zebra mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden. 99–210 pp.

Kirchman D.L. 2002. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* 39:91–100.

Kishore G.M., Jacob G.S. 1987. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 262(25): 12164-12168.

Kjaer J., Olsen P., Ullum M., Grant R. 2005. Leaching of glyphosate and amino-methylphosphonic acid from Danish agricultural field sites. *Journal of Environmental Quality* 34: 608–620.

Kononova S.V., Nesmeyanova M.A. 2002. Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry* 67(2): 184-195.

Kreutzweiser D.P., Kingsbury P.D., Feng J.C. 1989. Drift response of stream invertebrates to aerial applications of glyphosate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 42:331–338.

Kryger J., Riisgard H.U. 1988. Filtration rate capacities in 6 species of European freshwater bivalves. *Oecologia* 77:35-37.

Kryuchkova Y.V., Burygina G.L., Gogoleva N.E., Gogolev Y.V., Chernyshova M.P., Makarova O.E., Fedorova E.E., Turkovskaya O.V. 2014. Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiological Research* 169: 99–105.

Krzysko-Lupicka T., Sudol T. 2008. Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. *Chemosphere* 71: 1386-1391.

Kwiatkowska M., Nowacka-Krukowskab H., Bukowska B. 2014. The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. *Environmental toxicology and pharmacology* 37: 1101–1108.

Lindström E.S., Kamst-Van Agterveld M.P., Zwart G. 2005. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8201–8206.

Liong P.C., Hamzah W.P., Murugan V. 1988. Toxicity of some pesticides towards freshwater fishes. *Malaysian Agricultural Journal* 54: 147–156.

Liphadzi K.B., Al-Khatib K., Bensch C.N., Stahlman P.W., Dille J.A., Todd T., Rice C.W., Horak M.J., 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.

Liu C.M., Mclean P.A., Sookdeo C.C., Cannon F.C. 1991. Degradation of the herbicide Glyphosate by Members of the Family Rhizobiaceae. *Applied and Environmental Microbiology* 57(6): 1799-1804.

Lupini G., Proia L., Di Maio M., Amalfitano S., Fazi S. 2011. CARD-FISH and confocal laser scanner microscopy to assess successional changes of the bacterial community in freshwater biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 86:248-251.

Lydon J., Duke S. 1988. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 813-818.

Mackay D., Sieu W.Y., Ma K.C. 1997. Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate of Organic Chemicals. Lewis: New York.

Mackereth F.J.H., Heron J., Talling J.F. 1978. Water analysis: some revised methods for limnologists. *Scientific Publications of the Freshwater Biological Association* 36: 1-120.

Mansur M.C.D., Miyahira I.C., Clavijo C. 2014. Avanços do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei*, nas bacias do Grande do Sul, Brasil. In: XXX Congresso Brasileiro de Zoologia, Porto Alegre. Brasil.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 593-600.

Manz W., Amann R., Vancanneyt M., Schleifer K.H. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroidetes* in the natural environment. *Microbiology* 142: 1097-1106.

Martínez P, Bernal J, Castillo E, Agudelo E, Bernier S. 2012. Tolerancia y degradación del glifosato por bacterias aisladas de suelos con aplicaciones frecuentes de roundupsl®. Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana - Bogotá, Colombia. *Revista Pilquen, Sección Agronomía*. Año XIV. N° 12.

Matthaei C.H., Piggott J., Townsend C. 2010. Multiple stressors in agricultural streams: interactions among sediment addition, nutrient enrichment and water abstraction. *Journal of Applied Ecology* 47:639–649.

Menezes C.C., Fonseca M.B., Loro V.L., Santi A., Cattaneo R., Clasen B., Pretto A., Morsch V.M. 2011. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60: 665–671.

Mensah P.K., Muller W.J., Palmer C.G. 2012. Using growth measures in the freshwater shrimp *Caridina nilotica* as biomarkers of Roundup_ pollution of South African freshwater systems. *Physics and Chemistry of the Earth* 50–52: 262–268.

Meza-Joya F.L., Ramírez-Pinilla M.P., Fuentes-Lorenzo J.L. 2013. Toxic, cytotoxic, and genotoxic effects of a glyphosate formulation (Roundup®SL-Cosmosflux®411F) in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54: 362–373.

Mitchell D.G., Chapman P.M., Longs T.J. 1987. Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 39:1028–1035.

Modesto K.A., Martinez C.B.R. 2010a. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81: 781–787.

Modesto KA., Martinez C.B.R. 2010b. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78: 294–299.

Montalto L., Oliveros O.B., Ezcurra de Drago I., Demonte L.D. 1999. Peces del Río Paraná Medio, predadores de una especie invasora: *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae). *Revista Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas* 3: 85-101.

Moore L.J., Fuentes L., Rodgers J.H, Jr., Bowerman W.W., Yarrow G.K., Chao W.Y., Bridges W.C, Jr. 2012. Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup® to five north american anurans. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78: 128–133.

Moore J.K., Braymer H.D., Larson A.D. 1983. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. *Applied and Environmental Microbiology* 46(2): 316-320.

Morton B. 1975. The colonization of Hong Kong's raw water supply system by *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) (Bivalvia: Mytilacea) from China. *Malacological Review* 8:91–105.

Neef A. 1997. Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen biozöosen. PhD Thesis. Technische Universität München. Munich, Germany.

Newton R.J., Jones S.E., Helmus M.R., McMahon K.D. 2007. Phylogenetic ecology of the freshwater Actinobacteria acI Lineage. *Applied Environmental Microbiology* 73: 7169-7176.

Newton R.J., Stuart E. Jones S.E., Eiler A., McMahon K.D., Bertilsson S. 2011. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75: 14-49.

Nishimura Y., Nagata T. 2007. Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Aquatic Microbial Ecology* 48:231–240.

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

Oliveira M.D., Calheiros D.F., Jacobi C.M., Hamilton S.K. 2011. Abiotic factors controlling the establishment and abundance of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Biological Invasions* 13:717–729.

Oliveira M.D., Campos M.C, Paolucci E.M., Mansur M.C., Hamilton S.K. 2015. Colonization and Spread of *Limnoperna fortunei* in South America. En: Boltovskoy D. 2015 (Ed). *Limnoperna fortunei: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. Springer International Publishing, Cham (Switzerland). 333-352 pp.

Oliveira M.D., Hamilton S.K., Jacobi C.M. 2010. Forecasting the expansion of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei* in Brazilian and North American rivers based on its occurrence in the Paraguay River and Pantanal wetland of Brazil. *Aquatic Invasions* 5:59–73.

Palomino Cuya D.G., Brandimarte L., Popescu I., Alterach J., Peviani M. 2013. A GIS-based assessment of maximum potential hydropower production in La Plata basin under global changes. *Renew Energy* 50:103–114.

Paolucci E.M., Cataldo D.H., Boltovskoy D. 2010a. Prey selection by larvae of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Curimatidae): indigenous zooplankton versus veligers of the introduced bivalve *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mitilidae). *Aquatic Ecology* 44:255–267.

Paolucci E.M., Thuesen E.V., Cataldo D.H., Boltovskoy D. 2010b. Veligers of an introduced bivalve, *Limnoperna fortunei*, are a new food resource that enhances growth of larval fish in the Parana´ River (South America). *Freshwater Biology* 55: 1831-1844.

- Paolucci E.M., Cataldo D.H., Fuentes C.M., Boltovskoy D. 2007. Larvae of the invasive species *Limnoperna fortunei* (Bivalvia) in the diet of fish larvae in the Parana´ River, Argentina. *Hydrobiology* 589: 219–233.
- Pastorino G., Darrigran G. Martín S.M., Lunaschi L. 1993. *Limnoperna fortunei* (Dunker,1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. *Neotrópica* 39:34.
- Pearce D.A., Van der Gast C.J., Lawley B., Elis-Evans J.C. 2003. Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. *FEMS Microbiology Ecology* 45:59–70.
- Pearce D.A., Van der Gast C.J., Woodward K., Newsham K.K. 2005. Significant changes in the bacterioplankton community structure of a maritime Antarctic freshwater lake following nutrient enrichment. *Microbiology* 151:3237–3248.
- Penchaszadeh P.E., Darrigran G., Angulo C., Averbuj A., Brogger M.A., Dogliotti M., Pirez N. 2000. Predation of the invasive freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) by the fish *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1846 (Anostomidae) in the Río de la Plata, Argentina. *Journal of Shellfish Research* 19: 229-231.
- Pérez G.L., Torremorell A., Mugni H., Rodríguez P., Vera M.S., Do Nascimento M., Allende L., Bustingorry J., Escaray R., Ferraro M., Izaguirre I., Pizarro H., Bonetto C., Morris D.P., Zagarese H. 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications* 17: 2310–2322.
- Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R. 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria, *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3094–3101.
- Pernthaler J., Amann R. 2005. Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: Focus on populations. *Microbiology and Molecular biology reviews* 69: 440-461.

Pernthaler J., Zollner E., Warnecke F., Jürgens K. 2004. Bloom of filamentous bacteria in a mesotrophic lake: identity and potential controlling mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6272–6281.

Pernthaler. 2004. Protocol CARD-FISH. *Molecular Microbiology. Ecology Manual*. Second edition. 3-11: 711-726.

Peruzzo P.J., Porta A.A., Ronco A.E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in North Pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156(1): 61–66.

Pestana D.A., Ostrensky W.A., Pereira B., Pie M.R. 2009. The effect of temperature and body size on filtration rates of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) under laboratory conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 135-144.

Pipke R., Amrhein N. 1988. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (5): 1293-1296.

Pipke R., Amrhein N., Jacob G.S., Schaefer J., Kishore G.M. 1987. Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP. 1987. *European Journal of Biochemistry* 165: 267-273.

Pizarro H., Vera M.S., Vinocur A., Pérez G., Ferraro M., Menéndez H.R.:J, Dos Santos Afonso M. 2015a. Glyphosate input modifies microbial community structure in clear and turbid freshwater systems. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.

Pizarro H., Di Fiori E., Sinistro R., Ramírez M., Rodríguez P., Vinocur A., Cataldo D. 2015b. Impact of multiple anthropogenic stressors on freshwater: how do glyphosate and the invasive mussel *Limnoperna fortunei* affect microbial communities and water quality? *Ecotoxicology* 25(1): 56-68.

Pohlon E., Jürgens M., Küsel K. 2009. Pioneering bacterial and algal communities and potential extracellular enzyme activities of stream biofilms. *FEMS Microbial Ecology* 71: 364-373.

Poletta G.L., Larriera A., Kleinsorge E., Mudry M.D. 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental* 672(2): 95–102.

Reeders H.H., Bij de Vaate A. 1990. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): a new perspective for water quality management. *Hydrobiology* 200/201:437-450.

Relyea R.A. 2005a. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15: 618–627.

Relyea R.A. 2005b. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* 15: 1118–1124.

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

Relyea R.A., Schoeppner N.M., Hoverman J.T. 2005. Pesticides and amphibians: the importance of assemblage context. *Ecological Applications* 5: 1125–1134.

Ricciardi A. 1998. Global range expansion of the Asian mussel *Limnoperna fortunei* (Mytilidae): another fouling threat to freshwater systems. *Biofouling* 13:97–106.

Ricciardi A., Maclsaac H.J. 2011. Impacts of biological invasions on freshwater ecosystems. En: Richardson D.M (ed). Fifty years of invasion ecology: the legacy of Charles Elton. Oxford. UK. Wiley-Blackwell. 211-224pp.

Ricciardi A., Maclsaac H.J. 2000. Recent mass invasion of the North American Great Lakes by Ponto- Caspian species. *Trends in Ecology and Evolution* 15 (2): 62-65.

Ricciardi A., Rasmussen J.B. 1998. Predicting the identity and impact of future biological invaders: a priority for aquatic resource management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 1759-1765.

Rojas Molina F., Jose 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., Jose de Paggi S., Devercelli M. 2010. Zooplanktophagy in the natural diet and selectivity of the invasive mollusk *Limnoperna fortunei*. *Biological Invasions* 12: 1647- 1659.

Rojas Molina F., Jose de Paggi S., Frau D. 2012. Impacts of the invading golden mussel *Limnoperna fortunei* on zooplankton: a mesocosm experiment. *Zoological Studies* 51:733–744.

Rojas Molina F.S., Jose 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: 329-338.

Romero D.M., de Molina M.C.R., Juarez A.B. 2011. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(4): 741–747.

Sáenz M.E., Di Marzio W.D. 2009. Ecotoxicity of herbicide glyphosate to four chlorophyceae freshwater algae. *Limnetica* 28(1): 149–158.

Salcher M.M., Pernthaler J., Posch T. 2010. Spatiotemporal distribution and activity patterns of bacteria from three phylogenetic groups in an oligomesotrophic lake. *Limnology and Oceanography* 55:846–856.

Salisbury F.B., Ross C.W. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México. DF.

Sánchez M.L. 2012. Estructura de la comunidad perifítica y sus interacciones con la comunidad fitoplanctónica en lagunas turbias y claras de la llanura Pampeana (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias exactas y naturales. Universidad de Buenos aires.

Sánchez M.L., Schiaffino M.R., Pizarro H., Izaguirre I. 2015. Periphytic and planktonic bacterial community structure in turbid and clear shallow lakes of the Pampean Plain (Argentina): a CARD-FISH approach. *Latin American Journal of Aquatic Research* 43(4): 662-674.

Sancho J.V., Hernandez F., Lopez F.J., Hogendoorn E.A., Dijkman E. 1996. Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. *Journal of chromatography a*, 737(1): 75-83.

Sardiña P., Cataldo D., Boltovskoy D. 2008. The effects of the invasive mussel, *Limnoperna fortunei*, on associated fauna in South American freshwaters: importance of physical structure and food supply. *Fundamental and Applied Limnology (Archiv für Hydrobiologie)* 173:135-144.

Sardiña P., Chaves E., Marchese M. 2011. Benthic community responses to invasion by the golden mussel, *Limnoperna fortunei* Dunker: biotic homogenization vs environmental driving forces. *Journal of the Norteamerican Benthological Society* 30:1009–1023.

Schaffer J.D., Sebetich M.J. 2004. Effects of aquatic herbicides on primary productivity of phytoplankton in the laboratory. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72:1032–1037.

Schiaffino M.R. 2012. Análisis de la estructura del picoplancton y sus patrones biogeográficos en lagos comprendidos en una transecta Patagónico-Antártica. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias exactas y naturales. Universidad de Buenos aires.

Schiaffino M.R., Sánchez M.L., Gereá M., Unrein F., Balagué V., Gasol J., Izaguirre I. 2015. Distribution patterns of the abundance of Major bacterial and archaeal groups in Patagonian lakes. *Journal of Plankton research*: 1-19.

Sekar R., Pernthaler A., Pernthaler J., Warnecke F., Posch T., Amann R. 2003. An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2928-2935.

Servizi J.A., Gordon R.W., Martens D.W. 1987. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, Daphnia, and trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 39:15–22.

SIIA. 2015. Sistema integrado de información agropecuaria. Ministerio de agricultura, Ganadería y Pesca. Presidencia de la nación. Argentina. Disponible en: <http://www.siiia.gob.ar/>. Consultado: Diciembre 2015.

Šimek K., Horák K., Jezbera J., Nedoma J., Vrba J., Straškrábová V., Hahn M.W. 2006. Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environmental Microbiology* 8(9):1613-1624.

Solomon K.R., Thompson D.G. 2003. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health- Part B- Critical Review* 6(3): 289–324.

Stal L.J. 1994. Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance. Springer-Verlag. Nueva York.

Stalikas C.D., Konidari C.N. 2001. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *Journal of Chromatography A*. 907(1): 1-19.

Strayer D.L., Caraco N.F., Cole J.J, Findlay S., Pace M.L. 1999. Transformation of freshwater ecosystems by bivalves. *Bioscience* 49: 19-28.

- Strayer D.L., Hattala K.A., Kahnle A.W. 2004. Effects of an invasive bivalve (*Dreissena polymorpha*) on fish in the Hudson River estuary. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 61:924–941.
- Sylvester F., Boltovskoy D., Cataldo D.H. 2007. The invasive bivalve *Limnoperna fortunei* enhances benthic invertebrate densities in South American floodplain rivers. *Hidrobiology* 589: 15-27.
- Sylvester F., Dorado J.D., Boltovskoy D., Juarez D.A., Cataldo D. 2005. Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. *Hydrobiology* 534: 71-80.
- Taipale S., Jones R.I., Tirola M. 2009. Vertical diversity of bacteria in an oxygen-stratified humic lake, evaluated using DNA and phospholipid analyses. *Aquatic Microbial Ecology* 55:1–16.
- Thompson D.G., Wojtaszek B.F., Staznik B., Chartrand D.T., Stephenson G.R. 2004. Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision® herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4): 843–849.
- Travaglia C., Masciarelli O., Fortuna J., Marchetti G., Cardozo P., Lucero M., Zorza E., Luna V., Reinoso H. 2015. Towards sustainable maize production: Glyphosate detoxification by *Azospirillum sp.* and *Pseudomonas sp.* *Crop Protection* 77:102-109.
- Trejo J.A.V. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología.
- Trumbo J. 2005. An assessment of the hazard of a mixture of the herbicide Rodeo® and the non-ionic surfactant R-11® to aquatic invertebrates and larval amphibians. *California Fish and Game* 91(1): 38–46.
- Tsui M.T., Chu L.M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52(7): 1189-1197.

Van Deuren J., Lloyd T., Chhetry S., Liou, R., Peck, J. 2002. Remediation technologies screening matrix and reference guide. version 4.0.

Vera M. 2011. Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 202 pp.

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

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

Villar C.A., Mercado L., Rodrigues Capítulo A.R., Bonetto C. 1997a. Presencia del molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) en el bajo Paraná. *Gayana Zoología* 61: 87-96.

Villar C.A., Stripeikis J., Tudino M., D' Huicque L., Troccoli O., Bonetto C. 1997b. Use of invasive bivalves as biomonitor organisms for metal pollution at the Río de la Plata basin. En: 7° Conferencia Internacional sobre la Conservación y Gestión de Lagos (Lacar 97). San Martín de los Andes (Argentina).

Wan M.T., Watts R.G., Moul D.J. 1989. Effects of different dilution water types on the acute toxicity to juvenile Pacific salmonids and rainbow trout of glyphosate and its formulated products. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 43:378–385.

Wang Y.S., Yen J.H., Hsieh Y.N., Chen Y.L. 1994. Dissipation of 2,4-d glyphosate and paraquat in river water. *Water Air and Soil Pollution* 72(1-4):1–7.

Ward J.M., Ricciardi A. 2007. Impacts of *Dreissena* invasions on benthic macroinvertebrate communities: a meta-analysis. *Diversity and Distributions* 13:155–165.

Warnecke F., Sommaruga R., Sekar R., Hofer J.S., Pernthaler J. 2005. Abundances, identity, and growth state of actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5551–5559.

Williams G.M., Kroes R., Munro I.C. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31: 117–165.

Wu Q.L., Zwart G., Schauer M., Kamst-van Agterveld M.P., Hahn M.W. 2006. Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Applied and Environmental Microbiology* 72:5478–5485.

Wu X., Xi W.Y., Ye W.J., Yang H. 2007. Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology* 61:85–96.

Yu N., Culver D.A. 2000. Can zebra mussels change stratification patterns in a small reservoir? *Hydrobiology* 431:175–184.

Zanella O., Marena L.D. 2002. Ocorrência de *Limnoperna fortunei* in Central Hidroeléctrica de Itaipu. V Congreso Latinoamericano de Malacología. 30/06/02 al 04/07/02. San Pablo, Brasil. Resúmenes: 41.

Zar J.H. 1996. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey, USA, 662 pp.

Zavarzin G.A., Stackebrandt E., Murray R.G.E. 1991. A correlation of phylogenetic diversity in the Proteobacteria with the influences of ecological forces. *Canadian Journal of Microbiology* 37:1–6.

Zeder M., Peter S., Shabarova T., Pernthaler J. 2009. A small population of planktonic Flavobacteria with disproportionately high growth during the spring phytoplankton bloom in a prealpine lake. *Environmental Microbiology* 11:2676–2686.

Zwart G., Crump B.C., Agterveld M.P.K.V., Hagen F., Han S.K. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology* 28:141–155.

Zwart G., Hiorns W.D., Methé B. A., Van Agterveld M.P., Huismans R., Nold S.C., Laanbroek H.J. 1998. Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 21(4): 546-556.

Zwisler W., Selje N., Simon M. 2003. Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology* 31: 211-225.